



HAL
open science

Agrégation et immunisation contre les protéines thérapeutiques : étude de la maturation des cellules dendritiques et de la réponse lymphocytaire

Myriam Nabhan

► **To cite this version:**

Myriam Nabhan. Agrégation et immunisation contre les protéines thérapeutiques : étude de la maturation des cellules dendritiques et de la réponse lymphocytaire. Immunologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS576 . tel-03260428

HAL Id: tel-03260428

<https://theses.hal.science/tel-03260428>

Submitted on 15 Jun 2021

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.

Agrégation et immunisation contre les protéines thérapeutiques : étude de la maturation des cellules dendritiques et de la réponse lymphocytaire

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat: Immunologie

Thèse présentée et soutenue à Châtenay-Malabry, le 13 décembre 2019, par

Myriam Nabhan

Composition du Jury :

Bernard Maillère
Directeur de Recherche, Université Paris-Sud, Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot

Président du jury

Sylvie Fournel
Professeur des Universités, Université de Strasbourg, CNRS UMR7199

Rapporteur

Corinne Tanchot
Chargé de Recherche, INSERM U970-PARCC (PARis Cardiovascular Center)

Rapporteur

Philippe Moingeon
Directeur du Pôle de d'Innovation Thérapeutique des Maladies Immuno-inflammatoires, Laboratoires Servier

Examineur

Marc Pallardy
Professeur des Universités, Université Paris-Sud, INSERM UMR996

Directeur de thèse

Isabelle Turbica
Maître de Conférences, Université Paris-Sud, INSERM UMR996

Co-Encadrante de thèse

Table des matières

Liste des figures.....	10
Liste des tableaux.....	12
Liste des abréviations.....	13
Liste des publications et présentations.....	15
AVANT-PROPOS.....	17
INTRODUCTION.....	21
Chapitre I : Immunogénicité des biomédicaments.....	23
1. Définition et historique de l'immunogénicité.....	23
1.1. Premiers cas d'immunogénicité.....	23
1.2. Humanisation des anticorps monoclonaux.....	24
1.3. Les autres biomédicaments.....	26
1.4. Cas des anticorps anti-TNF α	27
2. Suivi des patients sous biothérapie.....	28
2.1. Détection et dosage des anticorps anti-biomédicaments.....	29
2.1.1. Principe.....	29
2.1.2. Méthodes de détection, dosage et caractérisation.....	30
2.2. Dosage des biomédicaments dans le sang circulant.....	35
2.2.1. Principe.....	35
2.2.2. Méthodes de dosage.....	36
3. Immunogénicité des différents types de biomédicaments.....	36
3.1. Incidence des anticorps anti-biomédicaments.....	36
3.1.1. Protéines homologues pour des protéines endogènes.....	36
3.1.2. Anticorps thérapeutiques et dérivés.....	37
3.2. Mécanismes déclenchant la formation des anticorps anti-biomédicaments.....	39
3.2.1. Rupture de tolérance.....	40
3.2.2. Présence de néo-épitopes.....	42
3.3. Conséquences cliniques.....	43
3.3.1. Conséquences sur l'efficacité.....	43
3.3.2. Conséquences sur la sécurité.....	46
4. Facteurs influençant l'immunogénicité des biomédicaments.....	48
4.1. Immunogénicité intrinsèque du produit.....	49
4.1.1. Présence d'épitopes T.....	49
4.1.2. Présence d'épitopes B.....	52
4.1.3. Modifications structurales post-traductionnelles.....	53
4.1.4. Formulation.....	54
4.1.5. Présence d'impuretés.....	55
4.1.6. Agrégation.....	56
4.2. Facteurs liés au patient.....	56
4.2.1. Statut immunitaire et pathologie.....	56
4.2.2. Fond génétique et prédisposition à l'immunisation.....	57
4.3. Facteurs liés au traitement.....	58
4.3.1. Durée, fréquence et doses injectées.....	58
4.3.2. Voies d'administration.....	59
4.3.3. Traitements immunosuppresseurs.....	60
Chapitre II : Agrégation des anticorps thérapeutiques et immunogénicité.....	62
1. Définition de l'agrégation.....	62

2.	Formation des agrégats	62
2.1.	Mécanismes de formation des agrégats.....	62
2.2.	Facteurs favorisant l'agrégation	65
2.2.1.	Structure de la protéine.....	65
2.2.2.	Dégradation chimique	66
2.2.3.	Concentration protéique	66
2.2.4.	Formulation	67
2.2.5.	Température.....	68
2.2.6.	Agitation.....	68
2.2.7.	Congélation et décongélation.....	69
2.2.8.	Lumière	69
2.2.9.	Pompage.....	70
2.3.	Méthodes de caractérisation des agrégats.....	70
2.4.	Contrôle de la formation des agrégats.....	72
2.4.1.	Au cours de la production industrielle.....	72
2.4.2.	Après la libération des lots cliniques.....	75
3.	Immunogénicité des agrégats d'anticorps thérapeutiques	77
3.1.	Observations cliniques.....	77
3.2.	Modèles animaux in vivo	78
3.2.1.	Modèles murins sauvages.....	79
3.2.2.	Modèles murins transgéniques.....	79
3.3.	Études in vitro	81
3.4.	Prédictions in silico	84
Chapitre III : Les étapes clés déclenchant une réponse immunitaire adaptative contre les anticorps thérapeutiques et agrégats.....		86
1.	Cellules dendritiques : intermédiaires entre les anticorps thérapeutiques et le système immunitaire adaptatif.....	86
1.1.	Capture et présentation de l'antigène	86
1.1.1.	Internalisation de l'antigène par les cellules dendritiques	87
1.1.2.	Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules du CMH.....	89
1.2.	Maturation et migration des cellules dendritiques	91
1.2.1.	Reconnaissance des signaux de danger par les cellules dendritiques	91
1.2.2.	Maturation et migration des cellules dendritiques.....	92
1.3.	Implication des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines G dans la réponse des cellules dendritiques	95
2.	Réponse des lymphocytes T.....	98
2.1.	Activation et prolifération des lymphocytes T	98
2.2.	Polarisation des lymphocytes T.....	99
2.3.	Réponse régulatrice des lymphocytes T.....	103
3.	Présence d'un répertoire de lymphocytes T reconnaissant l'antigène.....	104
3.1.	Développement du répertoire des lymphocytes T.....	104
3.2.	Répertoires T contre les anticorps thérapeutiques monoclonaux.....	106
4.	Mise en place de la réponse lymphocytaire B	107
PRÉSENTATION DU TRAVAIL		111
RÉSULTATS.....		117
Partie I : Mécanismes de l'activation des cellules dendritiques humaines et des lymphocytes T par les agrégats d'infliximab.....		119
Article : Activation des cellules dendritiques humaines et des lymphocytes T en réponse aux agrégats d'infliximab dépendante de la voie FcγRIIa-Syk		121

Partie II : Étude du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs reconnaissant les agrégats d'anticorps.....	161
Résultats complémentaires : Étude du répertoire de lymphocytes T CD4+ naïfs reconnaissant les agrégats d'anticorps	163
1. Introduction.....	163
2. Partie 1 : Cas des agrégats de taille micrométrique (1 à 10 µm).....	165
3. Partie 2 : Cas des oligomères solubles.....	180
DISCUSSION	187
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	203
BIBLIOGRAPHIE	209
ANNEXES	235

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes générations d'anticorps monoclonaux.	26
Figure 2 : Schéma proposé pour le suivi des patients sous biothérapie.	29
Figure 3 : Les méthodes de détection des anticorps anti-biomédicaments.....	32
Figure 4 : Les méthodes d'évaluation du caractère neutralisant des anticorps anti-biomédicaments.....	34
Figure 5 : Sites de fixation potentiels des anticorps anti-biomédicaments dans le cas des anticorps anti-TNF α	43
Figure 6 : Variation de la concentration sérique d'adalimumab au cours du temps en fonction du titre d'anticorps anti-adalimumab (AAA) chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde.	45
Figure 7 : Évolution de l'activité de la polyarthrite rhumatoïde chez les patients au cours du temps en fonction de la présence ou l'absence d'anticorps anti-adalimumab (AAA).	45
Figure 8 : Évolution du titre des anticorps anti-infliximab sériques chez un patient présentant une réaction d'hypersensibilité immédiate.	47
Figure 9 : Structure du cetuximab exposant la présence de galactose α -1,3 galactose au niveau du site de glycosylation des fragments Fab.	48
Figure 10 : Facteurs influençant l'immunogénicité des biomédicaments.	49
Figure 11 : Mécanisme de la formation d'agrégats.....	64
Figure 12 : Les différentes méthodes de quantification et/ou estimation de taille des agrégats.	72
Figure 13 : Sous-populations de cellules dendritiques et cellules apparentées.	87
Figure 14 : Voies d'internalisation des antigènes dans les cellules dendritiques.	88
Figure 15 : Phénotype des cellules dendritiques immatures ou matures.....	94
Figure 16 : Implication des récepteurs activateurs Fc γ R dans la réponse des cellules dendritiques à un complexe immun.	97
Figure 17 : Synapse immunologique entre la cellule dendritique et le lymphocyte T.....	99
Figure 18 : Polarisation des lymphocytes T.....	101
Figure 19 : Étapes de la sélection thymique induisant le développement du répertoire des lymphocytes T.....	105
Figure 20 : Caractérisation des agrégats d'infliximab produits après stress thermique.....	171

Figure 21 : Activation des cellules dendritiques en réponse aux agrégats d'infliximab HS. .	172
Figure 22 : Étude de l'internalisation des agrégats d'IFX HS1 et HS24 par les moDC par cytométrie en flux.....	173
Figure 23 : Schéma récapitulatif du protocole de co-culture autologues de cellules dendritiques et de lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs.	174
Figure 24 : Fréquence de LT CD4 ⁺ naïfs spécifiques de l'IFX natif ou agrégé HS1.	175
Figure 25 : Détection des LT CD4 ⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif et réactivité croisée avec la forme agrégée HS1.....	176
Figure 26 : Détection des LT CD4 ⁺ naïfs reconnaissant l'IFX agrégé HS1 et réactivité croisée avec la forme native.	178
Figure 27 : Implication des molécules du CMH de classe II dans l'activation des LT CD4 ⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif ou agrégé.	179
Figure 28 : Caractérisation des agrégats d'infliximab produits sous stress de lumière UV par chromatographie d'exclusion stérique.....	182
Figure 29 : Fréquence de LT CD4 ⁺ naïfs spécifiques de l'IFX natif ou agrégé UV.....	183
Figure 30 : Détection des LT CD4 ⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif et réactivité croisée avec la forme agrégée UV.	184
Figure 31 : Détection des LT CD4 ⁺ naïfs reconnaissant l'IFX agrégé UV et réactivité croisée avec la forme native.	185
Figure 32 : Mécanismes impliqués dans l'activation des cellules dendritiques humaines et des lymphocytes T par les agrégats d'infliximab.....	196

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques et indications des biomédicaments anti-TNF α approuvés aux États-Unis et en Europe.	28
Tableau 2 : Immunogénicité des biomédicaments homologues de protéines endogènes.	37
Tableau 3 : Immunogénicité des anticorps thérapeutiques et dérivés.	38
Tableau 4 : Classification des agrégats selon leur taille.	62
Tableau 5 : Les différentes méthodes de caractérisation des agrégats.	71
Tableau 6 : Stratégies recommandées pour réduire la formation d'agrégats au cours de la production industrielle des anticorps.	73
Tableau 7 : Stratégies contribuant à réduire le taux d'agrégats formés au cours de la production industrielle des anticorps.	74
Tableau 8 : Recommandations des Pharmacopées Européenne (Ph. Eur. 2.9.19) et Américaine (USP <788>) sur la présence de particules dans les préparations de biomédicaments.	75
Tableau 9 : Études in vivo évaluant l'immunogénicité des agrégats d'anticorps monoclonaux dans des modèles murins transgéniques.	80
Tableau 10 : Études in vivo évaluant l'immunogénicité des agrégats d'anticorps monoclonaux dans des modèles murins sauvages.	81
Tableau 11 : Caractéristiques des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines G humains.	95

Liste des abréviations

ADA	<i>Anti-drug antibodies</i>	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps	EMA	<i>European Medicine Agency</i>
AF	Alexa Fluor	EPO	Érythropoïétine
APR	<i>Aggregation prone regions</i>	ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
α -Gal	Galactose α -1,3 galactose	FcR	Récepteur au fragment Fc des immunoglobulines
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>	FDA	<i>Food and drug administration</i>
BCR	<i>B-cell receptor</i>	FR	<i>Framworks regions</i>
C(X)CL	Chimiokine	FVIII	Facteur VIII
C(X)CR	Récepteur de chimiokine	GH	Hormone de croissance
CD	Cluster de différenciation	HAHA	<i>Human anti-human antibody</i>
cDC	Cellule dendritique conventionnelle	HAMA	<i>Human anti-murine antibody</i>
CDC	Cytotoxicité médiée par le complément	HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
CDR	<i>Complementarity-Determining Regions</i>	HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>	HMSA	<i>Homogenous mobility shift assay</i>
CLR	<i>C-type lectine receptor</i>	HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité	HS	<i>Heat stress</i>
CPA	Cellule présentatrice d'antigène	HSA	<i>Human serum albumin</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>	IFN	Interféron
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>	IFX	Infliximab
DAS28	<i>Disease activity score 28</i>	Ig	Immunoglobuline
DC	Cellule dendritique	IL	Interleukine
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (Diffraction dynamique de la lumière)	IM	Injection intramusculaire
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ECL	Électrochimiluminescence	ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
		IV	Perfusion intraveineuse

IVIG	Immunoglobuline G intraveineuse	PRCA	<i>Pure red cell aplasia</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>	PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
LB	Lymphocyte B	PS80	Polysorbate 80
LC	Cellule de Langerhans	RGA	<i>Reporter gene bioassay</i>
LMNH	Lymphome malin non Hodgkinien	rhGM-CSF	<i>Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
LPS	Lipopolysaccharide	RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
LT	Lymphocyte T	RLR	<i>Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)-like receptor</i>
MAMP	<i>Microbial-associated molecular pattern</i>	SC	Injection sous-cutanée
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	scFv	<i>Single chain antibody variable fragment</i>
MAPPs	<i>MHC-associated peptide proteomics</i>	SEC	<i>Size exclusion chromatography (Chromatographie d'exclusion stérique)</i>
MC	Maladie de Crohn	SEP	Sclérose en plaques
MFI	<i>Micro-flow imaging (Imagerie de flux par microscopie)</i>	SH2	<i>Src homology 2</i>
moDC	Cellule dendritique dérivée de monocytes	SHIP	<i>SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase</i>
Nab	<i>Neutralizing antibodies</i>	SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
NAMP	<i>Nanoparticle-associated molecular pattern</i>	Syk	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κ B</i>	TCR	<i>T-cell receptor</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor</i>	T _{FH}	Lymphocyte T folliculaire helper
non-Nab	<i>Non-neutralizing antibodies</i>	TG	Souris transgénique
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique	Th	Lymphocyte T helper (auxiliaire)
PD-1	<i>Programmed death-1</i>	TLR	<i>Toll-like receptor</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>	TNF α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde	Treg	Lymphocyte T régulateur
PEG	Polyéthylène glycol	UV	Lumière ultraviolette
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase	WT	Souris sauvage (wild-type)
PR	Polyarthrite rhumatoïde		

Liste des publications et présentations

PUBLICATIONS

IL-27 Production and Regulation in Human Dendritic Cells Treated with the Chemical Sensitizer NiSO₄.

Rami Bechara, Myriam Nabhan, Diane Antonios, Hayat Azouri, and Marc Pallardy
Chemical Research in Toxicology. 2018;31(12):1323-1331.

Evaluation of in vitro Assays to Assess the Modulation of Dendritic Cells Functions by Therapeutic Antibodies and Aggregates.

Hannah Morgan, Su-Yi Tseng, Yann Gallais, Margret Leineweber, Pascale Buchmann, Sabrina Riccardi, Myriam Nabhan, Jeannette Lo, Zaahira Gani, Natacha Szely, Cornelia S. Zhu, Ming Yang, Andrea Kiessling, Hans-Werner Vohr, Marc Pallardy, Fred Aswad and Isabelle Turbica, on behalf of the ABIRISK Consortium
Frontiers in Immunology. 2019;10:601. doi: 10.3389/fimmu.2019.00601

Growth Hormone Aggregates Activation of Human Dendritic Cells Is Controlled by Rac1 and PI3 Kinase Signaling Pathways.

Myriam Nabhan, Yann Gallais, Marc Pallardy, Isabelle Turbica
Journal of Pharmaceutical Sciences. 2019; doi.org/10.1016/j.xphs.2019.09.007

The FcγRIIa-Syk axis controls infliximab aggregates induced human dendritic cells activation and T cell response.

Myriam Nabhan, François-Xavier Legrand, Minh Thang Le, Baptiste Robin, Rami Bechara, Nicolas Huang, Claire Smadja, Marc Pallardy and Isabelle Turbica
Soumis au Journal of Immunology.

COMMUNICATIONS ORALES

Therapeutic human growth hormone aggregates trigger dendritic cells activation and cell signaling pathways.

Myriam Nabhan, Yann Gallais, François-Xavier Legrand, Marc Pallardy and Isabelle Turbica
* *ABIRISK (Anti-Biopharmaceutical Immunization: prediction and analysis of clinical relevance to minimize the RISK) Annual Meeting and General Assembly – Florence, Italy ; Avril 2017*

Immunogénicité des biothérapies : activation des cellules dendritiques par les agrégats d'infliximab.

Myriam Nabhan, Marc Pallardy and Isabelle Turbica
* *XVIIIème Journée de l'Ecole Doctorale 2018 (Ma thèse en 180 secondes) – Châtenay-Malabry, France ; Juin 2018*

FcγRIIIa-Syk axis controls human dendritic cells activation by infliximab aggregates and T cell response.

Myriam Nabhan, François-Xavier Legrand, Minh Thang Le, Baptiste Robin, Rami Bechara, Nicolas Huang, Claire Smadja, Marc Pallardy and Isabelle Turbica

* 2nd Journées du Club Anticorps (Flash presentation) – Institut Imagine, France ; Octobre 2019

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

FcγRIIIa-Syk axis controls human dendritic cells activation by infliximab aggregates and T cell response.

Myriam Nabhan, François-Xavier Legrand, Minh Thang Le, Baptiste Robin, Rami Bechara, Nicolas Huang, Claire Smadja, Marc Pallardy and Isabelle Turbica

* 10th annual Young Researchers in Life Sciences conference – Institut Imagine, France ; Juin 2019

* 2nd Journées du Club Anticorps (Flash presentation) – Institut Imagine, France ; Octobre 2019

Infliximab aggregates trigger dendritic cells activation.

Myriam Nabhan, François-Xavier Legrand, Marc Pallardy and Isabelle Turbica

* Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie – Châtenay-Malabry, France ; Novembre 2017

(Prix du meilleur poster)

* 7ème Colloque annuel du LabEx LERMIT – Orsay, France ; Décembre 2017

Therapeutic human growth hormone aggregates trigger dendritic cells activation and cell signaling pathways.

Myriam Nabhan, Yann Gallais, François-Xavier Legrand, Marc Pallardy and Isabelle Turbica

* 8th annual Young Researchers in Life Sciences conference – Institut Imagine, France ; Mai 2017

* XVIIème Journée de l'Ecole Doctorale 569 – Châtenay-Malabry, France ; Juin 2017

AVANT-PROPOS

L'immunogénicité des biomédicaments constitue l'un des problèmes majeurs liés au traitement des patients et se traduit par la production d'anticorps dirigés contre le biomédicament (*anti-drug antibodies*, ADA). La détection de ces anticorps s'accompagne souvent d'une perte d'efficacité du traitement due à leur effet neutralisant. Par ailleurs, la présence d'agrégats protéiques dans le produit administré est un des facteurs contributifs au processus d'immunogénicité. En effet, la détection d'ADA de haute affinité chez les patients suggère la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative spécifique faisant intervenir les cellules dendritiques (DC) qui pourraient reconnaître les agrégats de protéines comme signal de danger, devenir matures et induire la mise en place d'une réponse lymphocytaire.

L'objectif de ce travail de thèse était de mieux comprendre l'interaction des agrégats d'anticorps thérapeutiques avec les DC et les conséquences sur la réponse des lymphocytes T (LT). Nous présentons dans la partie introductive de ce travail l'immunogénicité des biomédicaments en se focalisant dans un premier chapitre sur les mécanismes et les facteurs favorisant le développement des ADA. Dans un deuxième chapitre, nous abordons le problème de l'agrégation des anticorps thérapeutiques, en développant les mécanismes de formation des agrégats ainsi que leur rôle dans l'immunogénicité. Enfin, le dernier chapitre est consacré aux étapes clés de la réponse immunitaire adaptative dirigée contre les anticorps thérapeutiques et les agrégats.

La première partie expérimentale de ce travail avait pour objectif d'étudier les mécanismes cellulaires précoces impliqués dans le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative en réponse aux agrégats d'infliximab (**Article 1**, soumis au *Journal of Immunology*). Le second objectif était de mettre en évidence l'existence d'un répertoire de LT CD4⁺ naïfs spécifiques des agrégats d'infliximab (**Résultats complémentaires**) afin de mieux comprendre le rôle des agrégats dans la génération de néo-épitopes favorisant l'immunisation contre les anticorps thérapeutiques.

Parallèlement, nous nous sommes intéressés aux mécanismes intracellulaires induits par des agrégats de l'hormone de croissance recombinante humaine et impliqués dans l'activation des DC (**Annexe I**).

Par ailleurs, notre équipe était partenaire dans le consortium européen ABIRISK (*Anti-Biopharmaceutical Immunization: prediction and analysis of clinical relevance to minimize the RISK* ; 2012-2018), financé par l'*Innovative Medicine Initiative* et dont l'objectif était de développer une approche intégrative pour l'étude de l'immunisation des patients aux biomédicaments. En partenariat avec des industriels, nous avons étudié l'effet de quatre anticorps thérapeutiques et de leurs agrégats produits par différents types de stress, sur la modulation de la réponse des DC en mesurant les modifications phénotypiques induites via différents paramètres. Cette étude a permis de mettre en avant un modèle *in vitro* pour évaluer les capacités activatrices des agrégats de protéines thérapeutiques sur les DC (**Annexe II**).

INTRODUCTION

Chapitre I : Immunogénicité des biomédicaments

1. Définition et historique de l'immunogénicité

Une substance est dite immunogène lorsqu'elle a le pouvoir d'induire une réaction immunitaire spécifique et adaptative. De ce fait, l'immunogénicité d'un biomédicament se traduit, chez une fraction des patients traités, par le développement d'anticorps dirigés contre ce biomédicament, appelés ADA, pour *anti-drug antibodies* (Sauna et al., 2018; Stas et al., 2009).

1.1. Premiers cas d'immunogénicité

Les premiers cas d'immunogénicité de protéines à visée thérapeutique décrits dans la littérature datent de l'année 1905 avec des antitoxines isolées de sérums de chevaux immunisés utilisées dans le traitement de la diphtérie et du tétanos (Freiherr, 1905). Deux pédiatres, Clemens von Pirquet et Bela Schick, ont montré que l'administration d'antitoxines sériques induisaient la formation d'anticorps circulants spécifiques du sérum injecté et pouvant participer aux symptômes de la maladie sérique observée chez les patients traités (Silverstein, 2000). Quelques années plus tard, en 1922, l'insuline porcine est utilisée dans le traitement du diabète, cependant cette protéine était immunogène et 97 % des patients traités ont développé des anticorps anti-insuline. La production et la purification d'insuline humaine grâce aux avancées techniques dans le domaine du génie génétique ont permis en 1982 la mise sur le marché de la première protéine recombinante à visée thérapeutique. Ceci a permis de réduire l'immunogénicité observée avec l'insuline animale, avec une diminution des taux d'anticorps anti-insuline et des cas de réactions allergiques et de résistance au traitement (Deckert, 1985; Quianzon and Cheikh, 2012).

La technique des hybridomes découverte au cours du 20^{ème} siècle a permis le développement d'anticorps monoclonaux dont le muromonab (OKT3), premier anticorps monoclonal murin anti-CD3 à être utilisé chez l'homme dans le traitement du rejet aigu en transplantation rénale

(Hwang and Foote, 2005; Thistlethwaite et al., 1988). En plus des effets secondaires de cet anticorps liés à l'activation du système immunitaire, plus de 75 % des patients ont développé des anticorps anti-OKT3 (notamment IgM et IgG) anti-isotypes et anti-idiotypes, aussi appelés HAMA pour « *human anti-murine antibodies* », dès la deuxième semaine de traitement à l'OKT3 (Jaffers et al., 1986; Ortho Multicenter Transplant Study Group, 1985). Le taux de patients développant des anticorps anti-OKT3 varie en fonction de l'étude clinique, l'indication du traitement, l'organe greffé, l'administration concomitante d'immunosuppresseurs et le test de détection et de dosage utilisé (Kimball et al., 1995). Les anticorps anti-idiotypes sont responsables de la neutralisation de l'OKT3 et donc de la perte de l'efficacité clinique. De ce fait, l'humanisation des anticorps thérapeutiques était nécessaire pour réduire leur immunogénicité.

1.2. Humanisation des anticorps monoclonaux

Les avancées dans le domaine de l'ingénierie des protéines ont permis d'abord la production d'anticorps chimériques ne comportant que 30 % de fractions murines. Ces anticorps sont issus de la fusion de gènes codant pour des régions constantes humaines et des régions variables murines. La conservation d'une fraction variable de type murin permet le maintien de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps. Par ailleurs, la fraction constante humaine permet, grâce aux interactions potentielles avec les récepteurs au fragment Fc, d'assurer une fonction effectrice telle que la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) et la cytotoxicité médiée par le complément (CDC) observées par exemple avec le rituximab (Rituxan[®]), anticorps monoclonal anti-CD20 utilisé dans le traitement du lymphome non-Hodgkinien (Maloney et al., 2002; Scheen, 2009). En effet, il est possible de faire varier la fonction effectrice en fonction de l'isotype de l'anticorps. Par ailleurs, la chimérisation a permis d'augmenter la demi-vie des anticorps jusqu'à environ 15 jours (Gorman and Clark, 1990; Goupille, 2016; Scheen, 2009).

Des anticorps humanisés, avec plus de 90 % de fractions humaines, ont ensuite vu le jour en substituant les régions hypervariables (ou CDR pour *Complementarity-Determining Regions*) d'immunoglobuline humaine par des CDR murines, avec le daclizumab (Zenapax®) comme premiers anticorps anti-CD25 humanisé, ayant eu l'autorisation de mise sur le marché dans le rejet de greffe (Chames et al., 2009; Scheen, 2009). Cependant, ces anticorps peuvent avoir une affinité réduite à l'antigène par rapport à l'anticorps murin due aux modifications de la conformation spatiale des CDR qui est influencée par les régions variables dites charpentes ou *Frameworks Regions* (FR) d'origine humaine. Dans ces cas-là, il est nécessaire d'induire des mutations ponctuelles au niveau des FR humaines pour se rapprocher des séquences murines et augmenter l'affinité à l'antigène (Safdari et al., 2013; Schlapschy et al., 2004).

L'utilisation de nouvelles technologies telles que le phage display ou les animaux transgéniques a permis ensuite la production d'anticorps entièrement humains (Scheen, 2009). L'adalimumab (Humira®), anticorps anti-*tumor necrosis factor*-alpha (anti-TNF α), est le premier anticorps monoclonal humain mis sur le marché en 2002, il a été obtenu par la technique de phage display se basant sur des banques combinatoires de fragments variables d'anticorps humains exprimés à la surface de bactériophages (Hoogenboom, 2005). Le panitumumab (Vectibix®), anticorps anti-*epidermal growth factor receptor*, est quant à lui le premier anticorps humain obtenu par souris transgéniques exprimant des gènes d'immunoglobulines humaines et produisant ainsi des anticorps humains suite à leur immunisation avec l'antigène désiré (Lonberg, 2008).

Les différentes générations d'anticorps monoclonaux sont représentées dans la figure 1.

L'humanisation des anticorps devrait permettre de réduire leur immunogénicité cependant les études ont montré que même les anticorps entièrement humains pouvaient induire une réponse immunitaire conduisant à la production d'anticorps anti-biomédicaments ou HAHA pour *human anti-human antibodies* (Harding et al., 2010; Hwang and Foote, 2005).

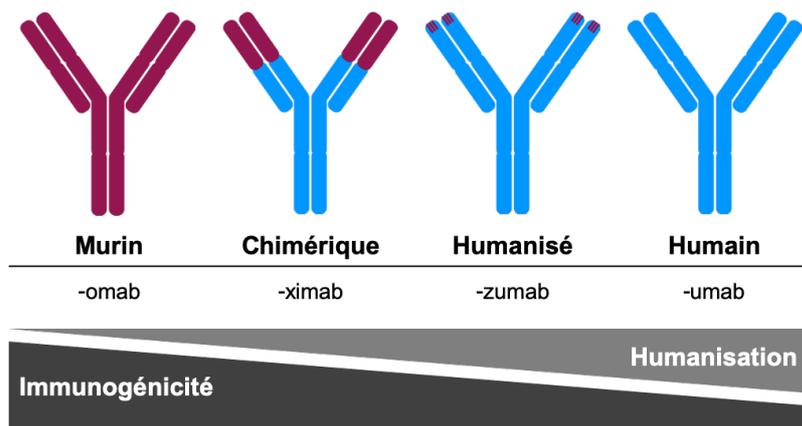


Figure 1 : Les différentes générations d'anticorps monoclonaux.

Le marché des anticorps monoclonaux est en expansion permanente avec une estimation de ventes à 130 - 200 milliards de dollars en 2022. Les anticorps humains constituent actuellement 54 % du marché contre 32 % pour les anticorps humanisés et 14 % pour les anticorps chimériques avec un total de 57 anticorps monoclonaux et 11 biosimilaires utilisés en clinique en 2017 (Grilo and Mantalaris, 2019).

Une liste exhaustive des anticorps thérapeutiques ayant une autorisation de mise sur le marché ou en cours d'essais cliniques peut être trouvée sur le site de l'IMGT[®], *the international ImMunoGeneTics information system*[®] <http://www.imgt.org> (founder and director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France) via le lien suivant <http://www.imgt.org/mAb-DB/index>.

D'autre part, une série d'articles annuels sous le nom de « *Antibodies to watch* » donne une mise à jour sur les anticorps thérapeutiques qui ont récemment eu les premières autorisations des agences du médicament ou vont les avoir durant l'année en cours. L'article le plus récent de la série est intitulé « *Antibodies to watch in 2019* » (Kaplon and Reichert, 2019).

1.3. Les autres biomédicaments

Même si moins documentés que l'immunogénicité des anticorps monoclonaux en clinique, les cas d'immunisation aux protéines recombinantes humaines, telles que l'insuline, l'érythropoïétine (EPO), l'hormone de croissance (GH), le FVIII et les interférons (IFN), sont

assez fréquents malgré l'homologie de séquence à leur équivalent endogène (Kuriakose et al., 2016).

De nouveaux formats de protéines recombinantes ont été plus récemment mis sur le marché avec des taux d'immunisation variant en fonction de la protéine (Goupille, 2016) :

- les fragments Fab, tel que le certolizumab pegol formé d'un Fab conjugué à 2 molécules de polyéthylène glycol lui conférant une demi-vie plus longue
- les protéines de fusion ou immunoadhésines formées d'un fragment Fc d'IgG fusionné à la partie extracellulaire d'un récepteur spécifique du ligand d'intérêt, telle que l'etanercept qui résulte de la fusion entre un fragment Fc et le domaine extra-cellulaire du récepteur au TNF α
- les protéines recombinantes, telle que l'anakinra, antagoniste du récepteur à l'interleukine-1 (IL-1) ne possédant pas de fragment d'anticorps.

1.4. Cas des anticorps anti-TNF α

Nous nous intéressons dans ce travail aux anticorps anti-TNF α et plus particulièrement à l'infliximab, premier anticorps anti-TNF α mis sur le marché. Cette classe de biomédicaments est essentiellement utilisée dans le traitement de maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn.

Les trois anticorps monoclonaux, infliximab, adalimumab et golimumab, sont capables de se lier au TNF α soluble et membranaire et d'induire la lyse de cellules productrices de TNF α . Le certolizumab pegol est également capable de se lier au TNF α soluble et membranaire mais n'a pas d'activité cytolytique étant dépourvu de fragment Fc. L'etanercept, protéine de fusion entre le fragment Fc d'une IgG1 et du récepteur de type 2 du TNF (TNF-R2), se lie au TNF α soluble bloquant ainsi sa fixation à ses récepteurs (Mitoma et al., 2018).

Les indications varient d'un biomédicament à l'autre selon les autorisations des agences compétentes, la FDA (*Food and Drug Administration*) aux États-Unis et l'EMA (*European Medicines Agency*) en Europe. Le tableau 1 ci-dessous résume les caractéristiques et les indications des biomédicaments anti-TNF α existant sur le marché.

Tableau 1 : Caractéristiques et indications des biomédicaments anti-TNF α approuvés aux États-Unis et en Europe.

Anti-TNF α	Caractéristiques	Voie * d'administration	Indications								Année d'autorisation aux États-Unis	Année d'autorisation en Europe	
			PR	MC	PP	RH	RP	SA	axSPA	AJI polyarti- culaire			
Infliximab	IgG1 Chimérique	IV	X	X	X	X	X	X	X			1998	1999
Adalimumab	IgG1 Humain	SC	X	X	X	X	X	X	X		X	2002	2003
Golimumab	IgG1 Humain	SC	X			X	X	X				2009	2009
Certolizumab pegol	Fragment Fab + PEG Humanisé	SC	X					X		X		2008	2009
Etanercept	Protéine de fusion	SC	X		X			X	X	X	X	1998	2002

AJI : arthrite idiopathique juvénile, axSPA : spondylarthrite axiale, IV : perfusion intraveineuse, MC : maladie de Crohn, PEG : polyéthylène glycol, PR : polyarthrite rhumatoïde, PS : psoriasis en plaques, RH : rectocolite hémorragique, RP : Rhumatisme psoriasique, SA : spondylarthrite ankylosante, SC : injection sous-cutanée

* IV : usage hospitalier, médicament d'exception ; SC : prescription initiale hospitalière

2. Suivi des patients sous biothérapie

En pratique clinique, il est nécessaire de pouvoir suivre la réponse des patients au biomédicament afin de vérifier l'efficacité clinique et de pouvoir optimiser le traitement en cas de perte de réponse clinique ou d'apparition d'effets secondaires indésirables. Ainsi, le suivi des patients traités par biothérapie se fait par l'évaluation de leurs symptômes cliniques, de la concentration résiduelle du biomédicament dans le sang circulant et de la présence et du titre des anticorps anti-biomédicaments afin de corréliser l'immunogénicité du traitement à la réponse clinique observée (figure 2).

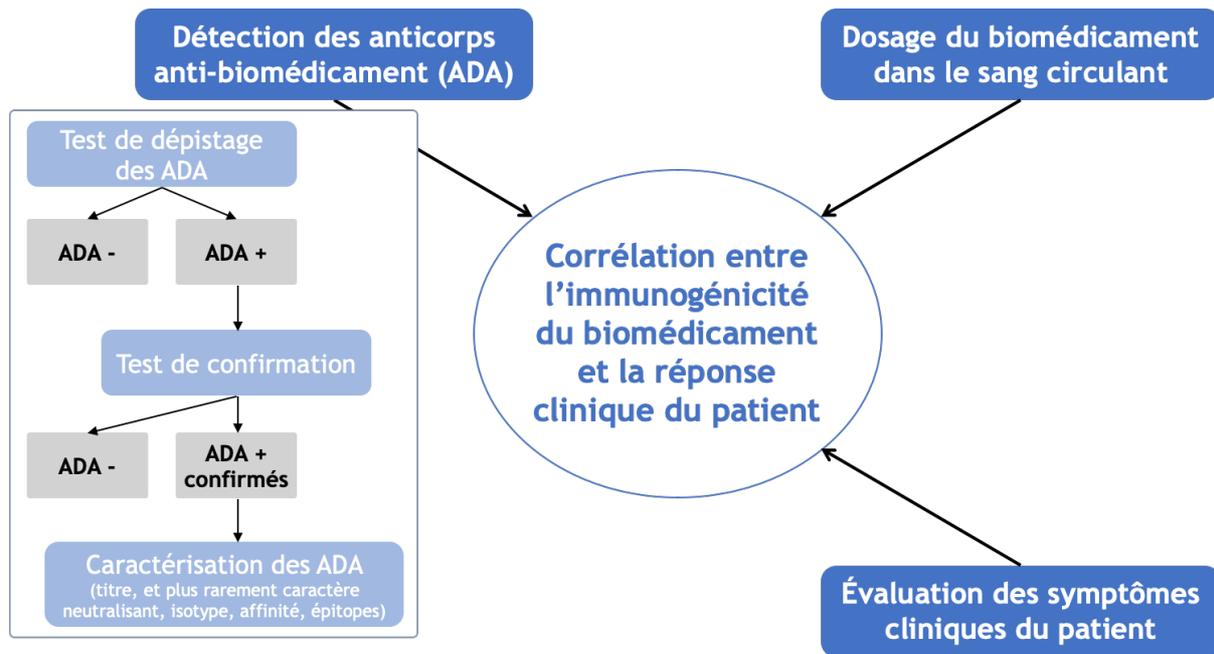


Figure 2 : Schéma proposé pour le suivi des patients sous biothérapie.

Adapté d'après les lignes directrices sur l'évaluation de l'immunogénicité des protéines thérapeutiques de l'agence européenne du médicament (European Medicines Agency, 2017)

2.1. Détection et dosage des anticorps anti-biomédicaments

2.1.1. Principe

Les méthodes de détection des ADA permettent de confirmer la présence ou l'absence des anticorps dans le sérum des patients en se basant sur leur capacité à se lier à la protéine thérapeutique (Wadhwa et al., 2015).

Selon les recommandations de l'agence européenne de médicament, au cours du développement des biomédicaments, la détection des ADA est effectuée en trois étapes, la première permet de dépister les échantillons potentiellement positifs en ADA, la deuxième confirme que ces échantillons ne sont pas des faux positifs et la dernière étape caractérise les ADA en déterminant leur titre, leur affinité, leurs isotypes, les épitopes dont ils sont spécifiques ainsi qu'en évaluant leur capacité neutralisante (European Medicines Agency, 2017) (figure 2). Par ailleurs, en routine clinique, la détection et le titrage des ADA sont principalement réalisés grâce à des kits commerciaux (Nasser et al., 2018).

2.1.2. Méthodes de détection, dosage et caractérisation

2.1.2.1. Détection et dosages des anticorps anti-biomédicaments

La conception des méthodes de détection des ADA doit suivre des recommandations spécifiques nécessaires pour la validation de ces tests de dépistage ce qui permet d'obtenir des résultats précis, sensibles, spécifiques et reproductibles (Mire-Sluis et al., 2004; Shankar et al., 2008; U.S. Food and Drug Administration, 2019).

Différentes méthodes ont été développées et validées pour la détection et le dosage des ADA : immunodosages enzymatiques (ELISA pour *enzyme-linked immunosorbent assay*), électrochimiluminescence (ECL), radio-immunodosages (RIA pour *radioimmunoassay*), résonance plasmonique de surface (SPR pour *surface plasmon resonance*), et plus récemment chromatographie liquide à haute performance (HPLC-HMSA, pour *homogenous mobility shift assay*).

L'ELISA reste la méthode plus utilisée en clinique. Les ELISA directs et indirects peuvent être utilisés, cependant l'ELISA sandwich (ou *bridging ELISA*) est le format le plus couramment employé. Cela consiste en la fixation des ADA présents dans le sérum des patients entre deux protéines thérapeutiques (figure 3a). La réaction enzymatique est mesurée par spectrophotométrie permettant la quantification du taux sérique d'ADA présents dans l'échantillon (Wadhwa et al., 2015).

La technique d'ECL se base sur le même principe de dosage que l'ELISA sandwich, avec une différence dans la conjugaison de la protéine de détection qui est couplée au Ruthénium (figure 3b). L'amplification du signal électrochimique obtenu grâce aux réactions d'oxydo-réduction induites suite à l'excitation de l'ion Ruthénium confère à l'ECL une sensibilité plus élevée que l'ELISA. Cette technique permet, dans certains cas, la détection d'anticorps de faible affinité et est souvent utilisée pour le dosage des anticorps dirigés contre les anticorps monoclonaux (Pineda et al., 2016; Wadhwa et al., 2015).

Les radio-immunodosages (RIA) sont également couramment utilisés dans la détection des ADA, cependant la présence de protéines radiomarquées parmi les réactifs limite leur emploi en clinique. Un exemple de RIA est l'*antigen-binding test* où les ADA sériques sont isolés par fixation sur protéine A puis révélés et quantifiés après ajout de la protéine thérapeutique radiomarquée (figure 3c). Contrairement à l'ELISA et à l'ECL, les RIA, à sensibilité élevée, permettent de détecter les anticorps d'isotype IgG4 ainsi que les anticorps de faible affinité (Wadhwa et al., 2015).

La résonance plasmonique de surface permet de détecter en temps réel les ADA sériques. Cette technique consiste en l'immobilisation du biomédicament à la surface d'un capteur SPR et la mesure de la liaison des ADA au biomédicament (figure 3d). Quoique moins sensible et de faible débit, l'avantage de la SPR par rapport aux autres méthodes de détection est sa capacité à détecter les anticorps de faible affinité. Elle permet également de distinguer les différents isotypes d'anticorps présents et donc peut être utilisée pour la caractérisation des ADA (Beeg et al., 2019; Wadhwa et al., 2015).

La technique HMSA permet quant à elle de déterminer les taux sériques de la protéine thérapeutique ainsi que des ADA dirigés contre cette protéine. Pour le dosage des ADA, la protéine thérapeutique couplée à l'alexa fluor 488 est utilisée comme substrat. L'HPLC est ensuite utilisée pour quantifier les complexes d'ADA et de protéine thérapeutique marquée formés (figure 3e) (Wang et al., 2012).

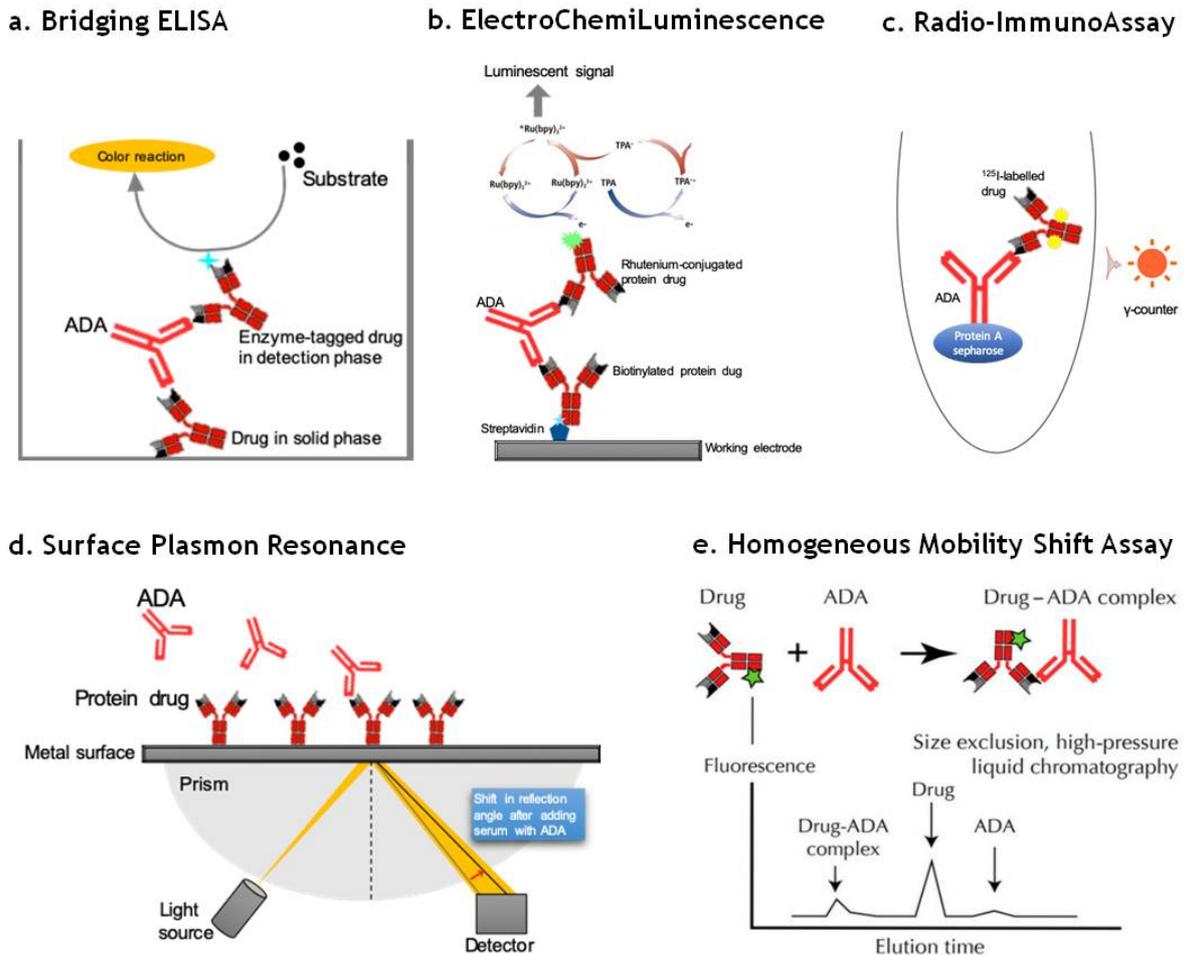


Figure 3 : Les méthodes de détection des anticorps anti-biomédicaments.

Adapté de (Bendtsen, 2013)

Une limite majeure de ces différentes techniques est l'interférence du biomédicament dans la détection des ADA. En effet, la présence du biomédicament en quantités importantes peut favoriser la formation de complexes biomédicament – ADA et ainsi réduire le taux d'ADA libres dans le sérum induisant un biais dans la détection des ADA par sous-estimation des taux d'ADA ou par obtention de faux-négatifs (Hart et al., 2011; Pineda et al., 2016). Plusieurs approches sont actuellement utilisées afin de remédier à ce problème. D'une part, il est possible de réduire l'interférence du biomédicament en modifiant certains paramètres physico-chimiques tels que la modification du pH par acidification du milieu permettant de dissocier les complexes biomédicament – ADA (European Medicines Agency, 2017; Pineda et al., 2016). D'autre part, une importance particulière est accordée au moment du prélèvement des

échantillons sériques pour le dosage des ADA et du biomédicament. Par exemple, dans le cas d'un traitement à l'infliximab, anticorps anti-TNF α injecté en perfusion intraveineuse (IV), le dosage doit être effectué lorsque le taux résiduel d'infliximab est au plus bas c'est-à-dire juste avant la nouvelle perfusion. En revanche, dans le cas de l'adalimumab, anti-TNF α injecté par voie sous-cutanée (SC), le dosage peut être fait à tout moment étant donné que les taux d'adalimumab sont relativement constants entre deux injections, toutefois il est recommandé que le dosage soit fait juste avant la nouvelle injection en cas de perte de réponse (Gorovits et al., 2018; Hendy et al., 2016).

2.1.2.2. *Évaluation du caractère neutralisant des anticorps anti-biomédicaments*

Les anticorps anti-biomédicaments sont dits neutralisants (NAb pour *neutralizing antibodies*) lorsqu'ils sont capables d'inhiber ou de réduire l'activité biologique du biomédicament et ceci en se liant au niveau ou à proximité du site d'action et induisant un encombrement et blocage de la liaison du biomédicament à sa cible. Par conséquent, si les ADA sont spécifiques d'épitopes distants du site d'action du biomédicament et n'affecte donc pas sa liaison à sa cible, ils sont considérés non neutralisants (non-NAb pour *non-neutralizing antibodies*).

L'évaluation du caractère neutralisant des ADA peut se faire à travers des tests cellulaires (*cell-based bioassay*) comme l'essai se basant sur l'expression d'un gène rapporteur (RGA pour *reporter-gene assay*) (Lallemand et al., 2011) ou des immunodosages enzymatiques par compétition (*competitive ligand binding assay*) où la liaison du biomédicament à sa cible biologique est inhibée en présence d'anticorps neutralisants (van Schie et al., 2015).

Ces tests sont par exemple utilisés pour caractériser les ADA dirigés contre les anticorps anti-TNF α tels que l'infliximab et l'adalimumab. Le test utilisant un gène rapporteur permet d'évaluer l'activité biologique de l'anti-TNF α en présence d'ADA, en détectant l'activité cellulaire du ligand TNF α (figure 4a) (Bendtzen, 2015; Lallemand et al., 2011).

L'immunodosage enzymatique par compétition peut être également utilisé. Un signal est détecté lorsque les complexes TNF α -biomédicament radiomarqué se lient aux ADA fixés sur protéine A, alors que l'absence de signal indiquerait que la liaison des ADA au biomédicament a été bloquée par le TNF α et que ces ADA sont neutralisants (figure 4b). Une étude utilisant ce test a montré que plus de 90% des ADA développés en réponse aux anti-TNF α (adalimumab, infliximab, golimumab, certolizumab) sont neutralisants (van Schie et al., 2015).

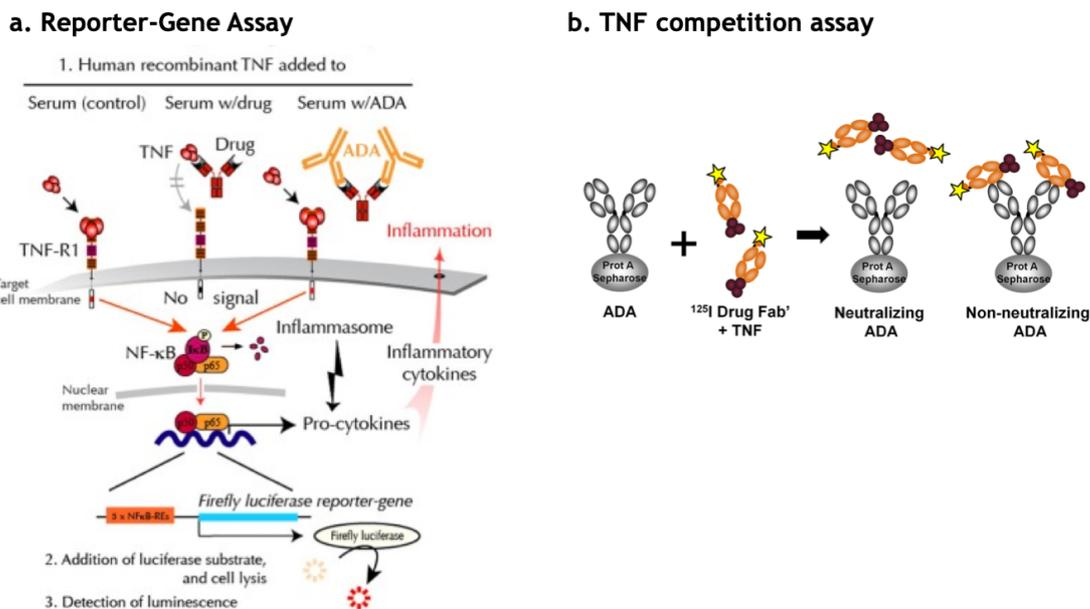


Figure 4 : Les méthodes d'évaluation du caractère neutralisant des anticorps anti-biomédicaments.

De (Bendtzen, 2015; van Schie et al., 2015)

Les agences du médicament recommandent d'évaluer le caractère neutralisant des ADA chez les patients séropositifs pour les ADA (European Medicines Agency, 2017; U.S. Food and Drug Administration, 2019). Cependant en pratique clinique, ces tests ne sont pas systématiquement faits étant donné que la présence d'ADA, qu'ils soient neutralisants ou non, induit au cours du temps une perte de la réponse clinique au biomédicament. En effet, même les ADA non neutralisants favoriseraient cette perte de réponse à cause de leur capacité à se lier au biomédicament et d'augmenter sa clairance (Gunn et al., 2016).

2.2. Dosage des biomédicaments dans le sang circulant

2.2.1. Principe

Le dosage du biomédicament dans le sang circulant est un outil essentiel en clinique pour l'ajustement de la dose administrée afin d'atteindre la concentration optimale associée à une meilleure réponse clinique. La concentration (sérique ou plasmatique) du biomédicament est un paramètre plus pertinent que la dose administrée et ceci est dû à la variabilité de la pharmacocinétique du biomédicament entre les patients ainsi que chez un même patient au fil du temps (Dreesen et al., 2017). La collecte des échantillons est souvent faite avant l'injection suivante afin de déterminer la concentration résiduelle du biomédicament, en parallèle du test de détection des ADA (Bastida et al., 2017).

Différentes études ont clairement montré une corrélation entre la concentration résiduelle du biomédicament et la réponse clinique observée. Une diminution du taux résiduel est ainsi associée à une perte partielle ou totale de la réponse au traitement. Cette diminution est également associée à une apparition d'ADA pouvant neutraliser le biomédicament et/ou augmenter sa clairance (Bastida et al., 2017; Papamichael et al., 2019). Plusieurs études se sont intéressées à déterminer les concentrations résiduelles optimales des biomédicaments notamment ceux utilisés dans le traitement des maladies inflammatoires. Ces études ont montré l'importance du suivi des concentrations des biomédicaments pour l'optimisation du traitement et l'amélioration de la réponse clinique (Bastida et al., 2017). Par exemple, il a été montré qu'une concentration résiduelle d'infliximab entre 3 et 7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ était optimale pour une meilleure rémission clinique dans le traitement des maladies inflammatoires de l'intestin ainsi que dans la polyarthrite rhumatoïde (Mulleman et al., 2009; Vande Casteele et al., 2015). Dans le cas de l'adalimumab, l'efficacité maximale était atteinte à une concentration résiduelle entre 5 et 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Paul et al., 2014; Pouw et al., 2015).

2.2.2. Méthodes de dosage

Différentes méthodes de dosage du biomédicament dans le sang circulant peuvent être utilisées dont l'ELISA, l'ECL, la RIA, la SPR et la HMSA (Beeg et al., 2019; Dreesen et al., 2017).

L'ELISA est la méthode la plus communément utilisée en France. Il existe des kits comprenant deux tests ELISA à faire en parallèle, l'un pour doser le biomédicament et l'autre pour détecter la présence d'ADA (Dreesen et al., 2017). D'autre part, la détermination de la concentration sérique du biomédicament par HMSA consiste en la quantification des complexes formés par le biomédicament libre présent dans le sérum et sa cible couplé à l'alexa fluor 488 (Wang et al., 2012).

3. Immunogénicité des différents types de biomédicaments

3.1. Incidence des anticorps anti-biomédicaments

Malgré l'existence de recommandations permettant d'unifier les critères de validation des différentes méthodes de détection et de caractérisation des ADA, il est difficile de comparer les résultats obtenus pour un biomédicament donné lors des différentes études cliniques menées. En effet, nous observons une variabilité dans l'incidence d'ADA ainsi que dans les caractéristiques de ces anticorps et ceci est dû d'une part à la variabilité des méthodes utilisées pour détecter les ADA et d'autre part à la variabilité des études cliniques (patients, maladies, traitement) et de la stratégie des études (durée de l'étude, moment de collecte des échantillons) (Gunn et al., 2016).

3.1.1. Protéines homologues pour des protéines endogènes

Comme précisé précédemment, l'immunogénicité des biomédicaments homologues pour des protéines endogènes est peu documentée, cependant plusieurs situations de perte d'efficacité et d'apparition d'effets secondaires indésirables en réponse au traitement ont nécessité

l'évaluation de la production d'ADA chez les patients. Ceci est le cas par exemple pour l'Eporex[®] (epoétine α), une EPO recombinante humaine pour laquelle il a été rapporté entre les années 1998 et 2004 des cas d'érythroblastopénie acquise (PRCA pour *Pure Red Cell Aplasia*), associés au développement d'anticorps neutralisants dirigés contre l'EPO recombinante et endogène (Swanson et al., 2004). Le tableau 2 ci-dessous indique quelques biomédicaments pour lesquelles l'immunogénicité a été évaluée.

Tableau 2 : Immunogénicité des biomédicaments homologues de protéines endogènes.

Biomédicament	Homologue endogène	Indication	Incidence d'ADA	Références
Insuline recombinante humaine	Insuline	Diabète	14-44 %	(Fineberg et al., 2007)
Somatotropine	Hormone de croissance (GH)	Déficit en hormone de croissance	7-22 %	(Rougeot et al., 1991)
Érythropoïétine recombinante humaine	Érythropoïétine (EPO)	Anémie associée à l'insuffisance rénale	Entre 1998 et 2004 : 18/100 000 patient-années, 191 cas identifiés Depuis 2005 : 0.2-0.3/100 000 patient-années	(Macdougall et al., 2015; McKoy et al., 2008)
FVIII recombinant humain	FVIII	Hémophilie A	5-30 %	(Ing et al., 2016)
Interféron α recombinante	Interféron α (IFN α)	Hépatite B ou C chronique	7-60 %	(Tovey and Lallemand, 2010)
Interféron B	Interféron B (IFNB)	Sclérose en plaque	IFNB-1a (IM) : 1,1-4,2 %, (SC) : 11,1-23 % IFNB-1b (SC) : 17.4-33.3 %	(Bachelet et al., 2016)

IM : injection intramusculaire, SC : injection sous-cutanée

3.1.2. Anticorps thérapeutiques et dérivés

Comme indiqué précédemment, les anticorps monoclonaux d'origine murine sont très immunogènes, avec un développement d'ADA ou HAMA (pour *human anti-murine antibody*) chez plus de 75 % des patients traités (Jaffers et al., 1986; Kuus-Reichel et al., 1994). L'humanisation des anticorps a permis de réduire leur immunogénicité, cependant le nombre de patients développant des ADA reste important et varie d'un biomédicament à l'autre en fonction de différents facteurs liés au patient, au traitement ainsi qu'à l'immunogénicité intrinsèque du produit. Le tableau 3 ci-dessous indique l'incidence d'ADA pour quelques anticorps thérapeutiques ou dérivés d'anticorps.

Tableau 3 : Immunogénicité des anticorps thérapeutiques et dérivés.

Biomédicament	Cible	Indication première	Incidence ADA	Références
Cetuximab IgG1, chimérique	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Cancer colorectal métastatique	3,4-5%	(van Brummelen et al., 2016; Dingman and Balulyer, 2019)
Infliximab IgG1, chimérique	TNF α	Polyarthrite rhumatoïde (PR) Maladie de Crohn (MC)	17,4 % (PR) 42-58 % (MC)	(Moots et al., 2017) (Ungar et al., 2014; Van Stappen et al., 2018)
Rituximab IgG1, chimérique	CD20 (lymphocytes B)	Lymphome malin non Hodgkinien (LMNH) Polyarthrite rhumatoïde (PR) Sclérose en plaque (SEP)	< 1 % (LMNH) 11,5 % (PR) 26-37 % (SEP)	(Maloney et al., 1997) (Einarsson et al., 2017) (Dunn et al., 2018)
Certolizumab pegol Fragment Fab + PEG, humanisé	TNF α	Polyarthrite rhumatoïde (PR)	37-65 %	(Berkhout et al., 2019; Jani et al., 2017)
Natalizumab IgG4, humanisé	Intégrine α 4	Sclérose en plaque (SEP)	5,1-6,8 %	(Bachelet et al., 2016)
Trastuzumab IgG1, humanisé	<i>Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)</i>	Cancer du sein HER2+	7,1 % (IV) 14,6 % (SC)	(Jackisch et al., 2015)
Adalimumab IgG1, humain	TNF α	Polyarthrite rhumatoïde (PR) Maladie de Crohn (MC)	28-57.4 % (PR) 21.4-32 % (MC)	(Bartelds et al., 2011; Bloem et al., 2015) (Ungar et al., 2018; Verstockt et al., 2018)
Golimumab IgG1, humain	TNF α	Polyarthrite rhumatoïde (PR)	31,7 %	(Leu et al., 2019)
Ipilimumab IgG1, humain	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4)</i>	Mélanome avancé	1,1-26 %	(Davda et al., 2019; Kverneland et al., 2018)
Nivolumab IgG4, humain	<i>Programmed death-1 (PD-1)</i>	Mélanome avancé	12,7 %	(Agrawal et al., 2017)
Abatacept Protéine de fusion	CD86	Polyarthrite rhumatoïde (PR)	2,8 %	(Haggerty et al., 2007)
Etanercept Protéine de fusion	TNF α	Polyarthrite rhumatoïde (PR)	< 5 %	(Klareskog et al., 2011; Polák et al., 2019)

IV : perfusion intraveineuse, LMNH : lymphome malin non Hodgkinien, MC : maladie de Crohn, PEG : polyéthylène glycol, PR : polyarthrite rhumatoïde, SEP : sclérose en plaque, SC : injection sous-cutanée

Suite à la détection des ADA, leur caractérisation permet de déterminer leurs isotypes ainsi que leur capacité neutralisante. Souvent les ADA circulants détectés sont des IgG, avec une nette prévalence d'IgG1 et d'IgG4 (Krishna and Nadler, 2016), toutefois il est important de noter que les méthodes de détection couramment utilisées, telles que l'ELISA et l'ECL, sous-estiment la présence d'IgG4 à cause de l'échange de fragment Fab (Hart et al., 2011; Wadhwa et al., 2015). En effet, ces méthodes nécessitent la présence des deux fragments Fab d'une IgG qui vont

permettre sa prise en sandwich entre deux biomédicaments, mais l'échange de fragment Fab des IgG4 aboutit souvent à la formation d'anticorps bispécifiques ne pouvant donc pas être détectés (Hart et al., 2011). D'autre part, l'évaluation de la capacité neutralisante des ADA permet de mieux expliquer les conséquences cliniques observées chez les patients.

Par exemple, dans le cas de l'immunisation à l'infliximab, les ADA sont à plus de 90 % neutralisants (van Schie et al., 2015) et sont majoritairement des IgG1 et IgG4 (Kosmač et al., 2011). Certaines études ont cependant permis la détection d'IgE et IgM chez les patients présentant des réactions d'hypersensibilité (van Schouwenburg et al., 2013; Vultaggio et al., 2010).

3.2. Mécanismes déclenchant la formation des anticorps anti-biomédicaments

La prédominance d'ADA d'isotype IgG chez les patients sous biothérapie indique que la production de ces ADA est induite par une réponse immunitaire T-dépendante. Ce type de réponse nécessiterait la prise en charge de la protéine thérapeutique par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) telle que la cellule dendritique (DC), son apprêtement et la présentation des peptides générés aux lymphocytes T (LT) auxiliaires CD4⁺. Les LT spécifiques des peptides présentés participent ainsi à l'activation des lymphocytes B (LB) qui se différencient en plasmocytes sécrétant des ADA persistants et de haute affinité suite à la commutation isotypique (Krishna and Nadler, 2016; Kuriakose et al., 2016). Les mécanismes cellulaires de la réponse immunitaire aux biomédicaments seront développés plus en détails dans le chapitre 3.

La mise en place de ces types de réponses immunitaires induisant la formation d'ADA en réponse au traitement par biomédicament repose sur deux mécanismes qui sont la rupture de la tolérance immune et la présence de néo-épitopes.

3.2.1. Rupture de tolérance

La sélection thymique et les mécanismes périphériques régulant la réponse immunitaire permettent de favoriser la tolérance des protéines endogènes ainsi que des protéines d'origine humaine. Cependant, dans certains contextes, cette tolérance immunitaire peut être rompue aboutissant au déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative. Dans le cas des protéines thérapeutiques homologues à des protéines endogènes, la rupture de tolérance est favorisée en cas de déficience en protéine endogène (Krishna and Nadler, 2016). Dans ces conditions, la sélection thymique ne permettrait pas l'élimination complète des LT autoréactifs spécifiques de la protéine endogène qui favoriseraient ultérieurement la mise en place d'une réponse immunitaire. De plus, la présence de signaux adjuvants concomitants au traitement favoriserait la rupture de tolérance via l'activation des LT spécifiques (Jawa et al., 2013). Différents signaux adjuvants peuvent participer à ce mécanisme déclenchant une réponse immunitaire adaptative et sont souvent liés à la présence, dans le produit administré, d'agrégats, de contaminants ou d'impuretés (Kuriakose et al., 2016).

De manière générale, la rupture de tolérance a lieu suite à une exposition répétée au biomédicament et le taux d'ADA formés diminue souvent après arrêt du traitement. Ceci est d'ailleurs le cas du traitement à l'époétine α (Eprex[®]) au début des années 2000. Entre les années 1998 et 2004, plus de 175 cas de PRCA associée au développement d'anticorps dirigés contre le biomédicament ont été détectés (Bennett et al., 2004). Une étude de Casadevall et collaborateurs a montré que le sérum de 13 patients traités à l'époétine et présentant une anémie réfractaire inhibait la prolifération de progéniteurs érythroïdes de donneurs sains mais ne modulait pas la formation de colonies de granulocytes. Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence chez ces patients la présence d'anticorps anti-EPO pouvant neutraliser l'époétine et l'EPO endogène (Casadevall et al., 2002). L'arrêt du traitement et l'administration d'immunosuppresseurs a toutefois permis la diminution du taux d'anticorps anti-EPO et la

restauration du taux d'hématies circulantes (McKoy et al., 2008). Plusieurs hypothèses ont été émises pour tenter d'expliquer ce phénomène de rupture de tolérance, dont la formation d'agrégats d'époétine favorisée par la présence de tungstène dans les seringues préremplies (Seidl et al., 2011) ou par des concentrations élevées de polysorbate 80 (PS80) ou par de longues durées de stockage, ou la présence d'impuretés issues du caoutchouc des seringues préremplies induisant la formation de micelles en présence de PS80 (Macdougall et al., 2012). Toutefois, une étude récente a confirmé que la présence de quantité élevée de tungstène dans des lots cliniques d'époétine induisait la formation d'agrégats d'EPO. Ces agrégats ont induit la prolifération de LT dans un modèle de co-cultures autologues de DC et de LT CD4⁺ de donneurs sains, contrairement à l'époétine non agrégée, issue de seringues contenant de faibles quantités de tungstène. Par ailleurs, les agrégats d'EPO ont également induit la prolifération des LT d'un patient traité par un des lots cliniques étudiés et chez qui ont été détectés des anticorps anti-EPO d'isotypes IgG1 et IgG4. Ainsi cette étude a permis de mettre en évidence la cause de la rupture de tolérance à l'EPO (Rubic-Schneider et al., 2017).

Un autre exemple de rupture de tolérance en réponse aux biothérapies est celui du traitement des patients hémophiliques par le facteur VIII (FVIII) recombinant. Toutefois, le mécanisme induisant le développement d'inhibiteurs du FVIII dépend de la sévérité du déficit. L'hémophilie est dite mineure quand l'activité plasmatique du FVIII est comprise entre 6 et 30 %, modérée, entre 1 et 5 %, et sévère lorsqu'elle est indétectable. Ainsi, en cas d'hémophilie sévère l'absence totale de FVIII endogène est responsable d'un défaut de tolérance vis-à-vis de la protéine. Le FVIII recombinant est donc considéré comme du non-soi par le système immunitaire et provoque une réponse immunitaire classique. Par contre, les patients présentant une hémophilie mineure à modérée développeraient des ADA suite à une rupture de tolérance (Delignat et al., 2018). Il a récemment été montré que la présence d'un signal de danger pourrait favoriser la réponse lymphocytaire spécifique du FVIII. Ainsi des DC humaines *in vitro*

stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) jouant le rôle de signal de danger et par le FVIII induisaient la prolifération de LT CD4⁺ autologues d'une manière plus importante que des DC stimulées uniquement par du LPS ou du FVIII (Miller et al., 2018).

3.2.2. Présence de néo-épitopes

La présence de séquences peptidiques reconnues comme étrangères par le système immunitaire favorise la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Ainsi, la présence de séquences murines dans les anticorps monoclonaux (essentiellement de types murins et chimériques) favorise la formation d'ADA spécifiques. Les anticorps humanisés comportent quant à eux des régions hypervariables d'origine murine ainsi que des mutations au niveau des régions variables qui peuvent également induire la formation d'ADA. Dans le cas des anticorps entièrement humains, malgré l'absence de séquences murines, des réactions immunitaires aboutissant à la formation d'ADA peuvent avoir lieu et ces anticorps sont souvent anti-idiotypiques et sont dirigés contre des épitopes des régions hypervariables CDR (Harding et al., 2010). Les différents sites de fixation possible des ADA sur un biomédicament sont représentés dans la figure 5.

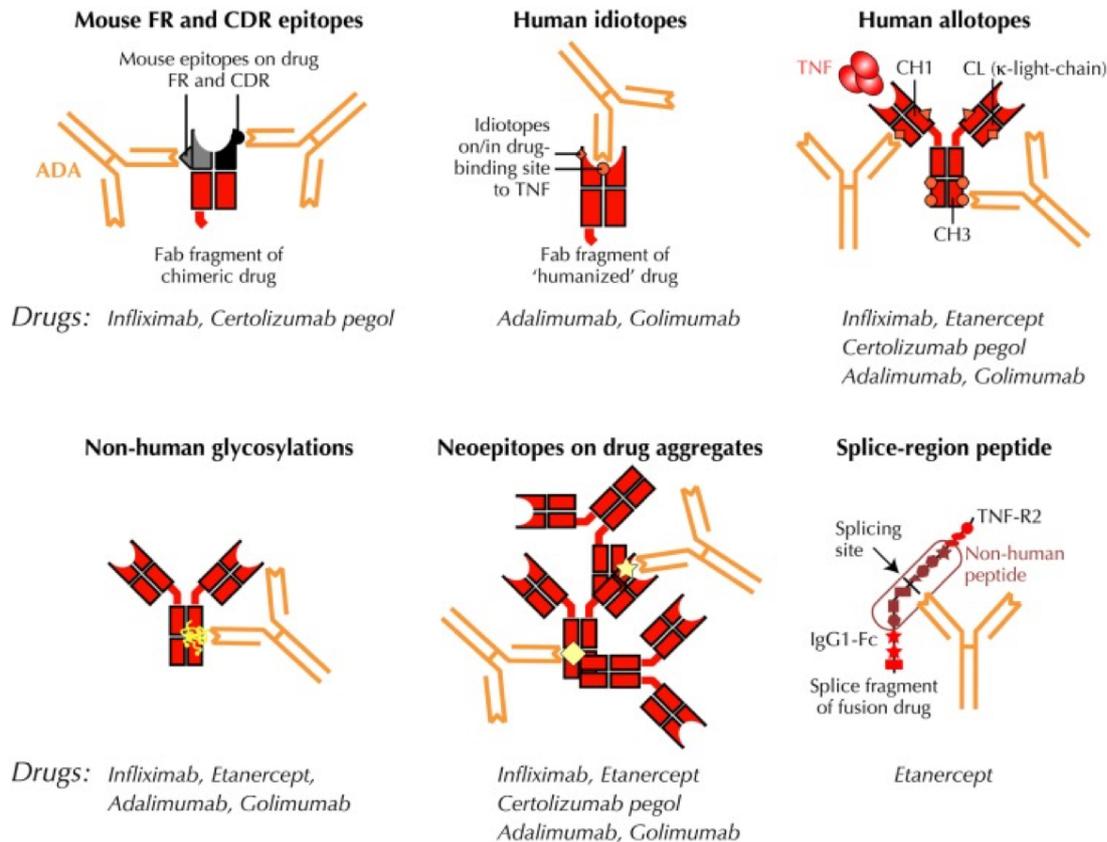


Figure 5 : Sites de fixation potentiels des anticorps anti-biomédicaments dans le cas des anticorps anti-TNF α .

De (Bendtzen, 2015)

3.3. Conséquences cliniques

Les conséquences cliniques de la formation d'ADA chez les patients sous biothérapie varient selon les caractéristiques de ces anticorps, notamment leur taux, leur capacité neutralisante qui dépendra de l'épitope qu'ils reconnaissent sur le biomédicament administré ainsi que leur isotype. Les ADA peuvent alors conduire à l'échec de la thérapie et/ou être associés à des effets secondaires indésirables.

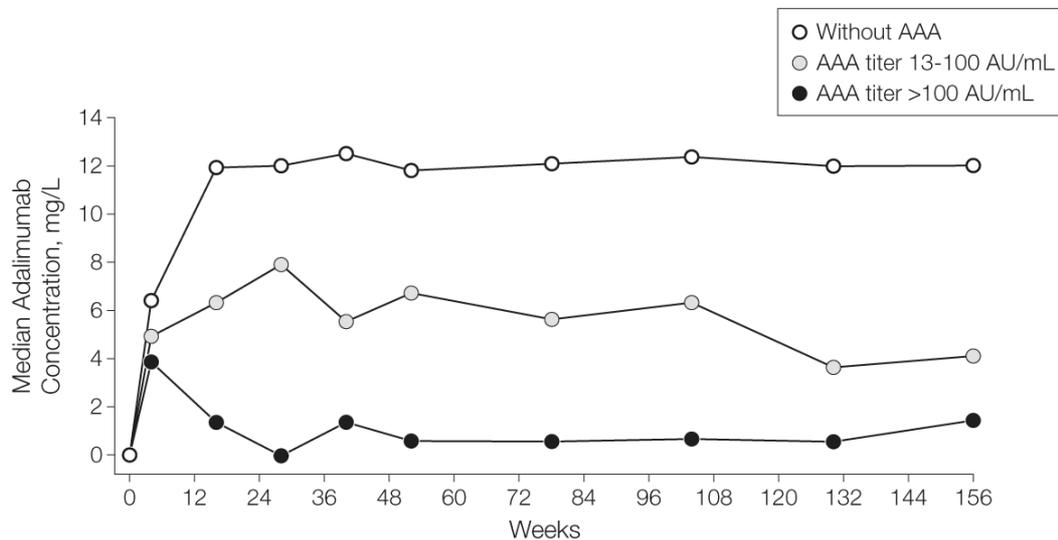
3.3.1. Conséquences sur l'efficacité

Quel que soit leur capacité neutralisante, les ADA peuvent se lier à la protéine thérapeutique et former des complexes immuns ce qui peut accélérer son élimination. En effet, la formation de complexes immuns peut induire une augmentation de la clairance du biomédicament et ainsi

réduire sa demi-vie plasmatique (Doevendans and Schellekens, 2019). Il est ainsi actuellement admis qu'une diminution du taux résiduel de la protéine thérapeutique est associée au développement d'ADA et à la perte partielle ou totale de la réponse au traitement (Papamichael et al., 2019).

De faibles taux d'anticorps non-neutralisants et transitoires n'ont généralement pas ou peu d'effet clinique sur le traitement qui est dans ce cas maintenu comme par exemple avec l'insuline. Cependant, la présence de taux élevés d'anticorps neutralisants et persistants conduit de manière sûre à une perte de l'efficacité clinique. Ces ADA neutralisent le biomédicament en se fixant au niveau ou à proximité du paratope modulant ainsi sa pharmacocinétique et sa pharmacodynamie. D'une part la clairance du biomédicament est augmentée suite à la formation des complexes immuns, et d'autre part le site de liaison du biomédicament à sa cible est bloqué ce qui induit une perte d'efficacité du traitement. Ceci a notamment été montré dans le cas des anticorps anti-TNF α où la formation d'ADA neutralisants est accompagnée d'une diminution de la concentration sérique du biomédicament et d'une réduction de l'efficacité clinique (Bartelds et al., 2011; Cludts et al., 2017; Siljehult et al., 2018). Comme précisé précédemment les ADA sont à plus de 97 % neutralisants pour l'adalimumab, le certolizumab pegol et le golimumab, et à plus de 90 % pour l'infliximab (van Schie et al., 2015). Une étude de Bartelds et collaborateurs a ainsi montré que la concentration sérique d'adalimumab restait élevée en absence d'AAA (pour *anti-adalimumab antibodies*) mais diminuait en présence d'AAA lorsque le titre d'AAA était entre 13 et 100 AU.mL⁻¹ (AU étant une unité arbitraire) et devenait presque nulle lorsque le titre d'AAA dépassait 100 AU.mL⁻¹ (figure 6). Par ailleurs, l'activité de la polyarthrite rhumatoïde évaluée par le score DAS28 (*Disease activity score 28*) varie en fonction de la présence d'AAA. Ainsi, le score DAS28 inférieur à 2,6, reflétant une polyarthrite rhumatoïde en rémission, et le score DAS28 inférieur à 3,2, reflétant une polyarthrite de faible activité, sont atteints chez une proportion plus élevée de patients n'ayant

pas d'AAA. De plus, une proportion très faible de patients présentant des titres élevés d'AAA (supérieurs à 100 AU.mL⁻¹) atteint un score DAS28 inférieur à 3,2 (figure 7) (Bartelds et al., 2011).



Week	0	4	16	28	40	52	78	104	130	156
No. of patients										
Without AAA	196	187	177	164	145	139	131	118	107	93
AAA 13-100 AU/ml	45	43	42	37	34	34	28	24	19	17
AAA >100 AU/ml	31	31	28	27	22	19	16	14	11	8

Figure 6 : Variation de la concentration sérique d'adalimumab au cours du temps en fonction du titre d'anticorps anti-adalimumab (AAA) chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde.

De (Bartelds et al., 2011)

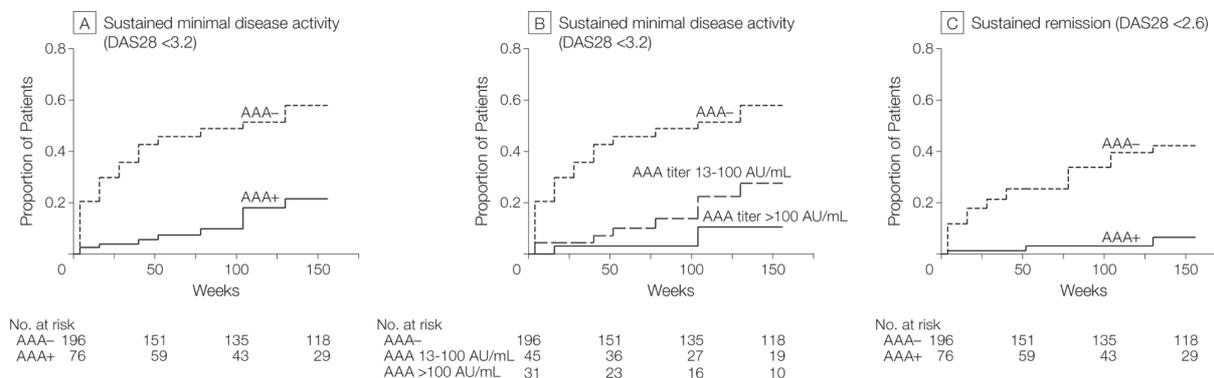


Figure 7 : Évolution de l'activité de la polyarthrite rhumatoïde chez les patients au cours du temps en fonction de la présence ou l'absence d'anticorps anti-adalimumab (AAA).

De (Bartelds et al., 2011)

D'autre part, la spécificité des ADA pour des épitopes communs avec la protéine endogène peut avoir des conséquences cliniques graves. L'exemple le plus connu de réactivité croisée avec la protéine endogène est celui de l'EPO recombinante (Eprex®) que nous avons déjà décrit. Les ADA produits neutralisaient l'EPO endogène en inhibant son interaction avec son récepteur, bloquant ainsi son activité et aboutissant à une érythroblastopénie acquise. Ces ADA présentaient également une réaction croisée avec les autres spécialités d'EPO recombinantes commercialisées (Evens et al., 2005; Macdougall et al., 2015).

3.3.2. Conséquences sur la sécurité

La présence d'ADA peut également induire des effets indésirables se traduisant souvent par des réactions d'hypersensibilité plus ou moins graves.

Les réactions d'hypersensibilité liées aux ADA dirigés contre les anticorps monoclonaux apparaissent le plus souvent suite à l'administration répétée du biomédicament comme il a été observé avec l'infliximab et le rituximab (Picard and Galvão, 2017). Dans le cas de l'infliximab, près de 12 % des patients présentent des réactions liées à l'infusion (notamment prurit, rougeur de la peau et dyspnée) apparaissant en moyenne suite à la 7^{ème} perfusion (Brennan et al., 2009; Choquette et al., 2015; Matucci et al., 2013). Ces réactions peuvent être immédiates et avoir lieu dans les premières heures suivant l'administration de l'infliximab. Des études ont mis en évidence la présence d'IgE anti-infliximab chez certains patients, cependant le titre en IgE diminuait rapidement quelques jours après la réaction d'hypersensibilité (figure 8) (Matucci et al., 2013; Nencini et al., 2018; Vultaggio et al., 2010). L'étude de la réponse lymphocytaire de patients sous infliximab a montré une sécrétion accrue de cytokines polarisantes de type 2 (IL-5 et IL-13) par les LT CD4⁺ de patients IgE⁺ ayant préalablement présentés des réactions d'hypersensibilité dans un modèle de co-cultures autologues de LT CD4⁺ et de DC (Vultaggio et al., 2016). La sensibilité du test de détection des IgE, le faible titre d'IgE sériques ainsi que

la présence majoritaire d'IgG anti-infliximab peuvent interférer dans la détection des IgE (Matucci et al., 2013). L'absence d'IgE chez des patients présentant des réactions d'hypersensibilité suggère que les réactions non IgE-médiées pourraient être induites par la formation de complexes immuns entre l'infliximab et les IgG anti-infliximab (Steenholdt et al., 2011). En effet, la présence de complexes immuns de tailles variées a été mise en évidence dans l'heure suivant la perfusion d'infliximab chez deux patients non répondeurs et présentant des réactions d'hypersensibilité immédiates (van der Laken et al., 2007). Des réactions retardées avec des symptômes similaires à la maladie sérique (malaise, fièvre, douleurs musculaires et articulaires intenses...) sont observées chez 1 à 3 % patients sous infliximab après 5 à 7 jours de la perfusion en moyenne. Ces réactions sont dues ont dépôts de complexes immuns d'infliximab-ADA au niveau des articulations, de la peau et des vaisseaux sanguins (Lichtenstein et al., 2015). Les cas décrits sont souvent observés après interruption prolongée du traitement (Gamarra et al., 2006; Grosen et al., 2013; Miheller et al., 2007).

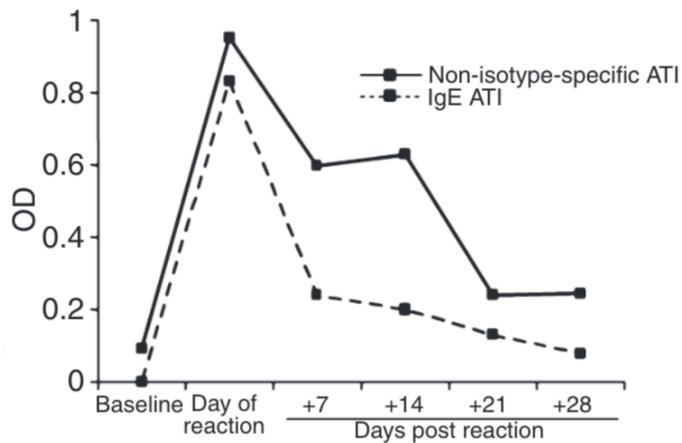


Figure 8 : Évolution du titre des anticorps anti-infliximab sériques chez un patient présentant une réaction d'hypersensibilité immédiate.

De (Vultaggio et al., 2010)

Une augmentation du titre d'anticorps anti-infliximab totaux (*non-isotype-specific ATI*) et d'IgE anti-infliximab (*IgE ATI*) est observée le jour de la réaction liée à la perfusion d'infliximab. Le taux d'ADA diminue progressivement dans les semaines suivant la perfusion, avec une diminution importante des IgE dès 7 jours post-perfusion.

Par ailleurs, des réactions anaphylactiques sont apparues lors de la première exposition de patients traités par le cetuximab. Les symptômes observés étaient les suivants : obstruction des voies respiratoires, hypotension, choc, perte de conscience, infarctus du myocarde et arrêt cardiaque. Une prévalence de 22 % de ces réactions a été déterminée chez des patients du Sud-Est des États-Unis (O’Neil et al., 2007). Ces réactions étaient dues à la préexistence d’anticorps IgE dirigés contre le motif galactose α -1,3 galactose (α -Gal), oligosaccharide présent au niveau des fragments Fab du cetuximab (figure 9) (Chung et al., 2008). Il s’est avéré par la suite que des morsures de tiques pourraient être à l’origine de cette sensibilisation à l’ α -Gal (Commins et al., 2011).

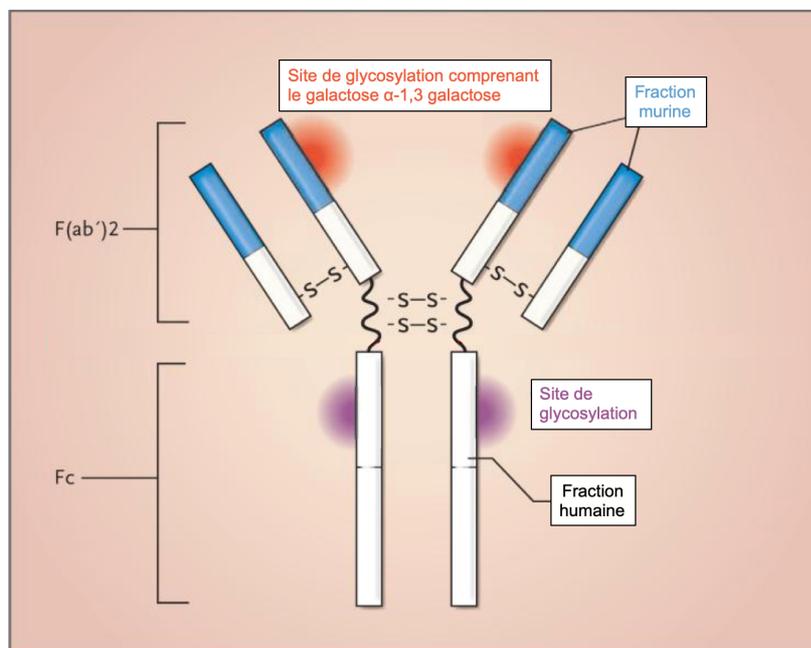


Figure 9 : Structure du cetuximab exposant la présence de galactose α -1,3 galactose au niveau du site de glycosylation des fragments Fab.

De (Chung et al., 2008)

4. Facteurs influençant l’immunogénicité des biomédicaments

L’immunogénicité des biomédicaments a tout d’abord été décrite avec des produits d’origine animale (murine, porcine, bovine...), longtemps considérée comme la cause principale du déclenchement de la réponse immunitaire détectée chez les patients et la production d’ADA.

Cependant l'humanisation des protéines thérapeutiques a réduit leur immunogénicité, mais n'a pas permis de l'abolir. Depuis, les études ont souligné de nombreux facteurs favorisant l'immunogénicité, qui sont liés non seulement au produit mais également au patient et au traitement suivi (figure 10).

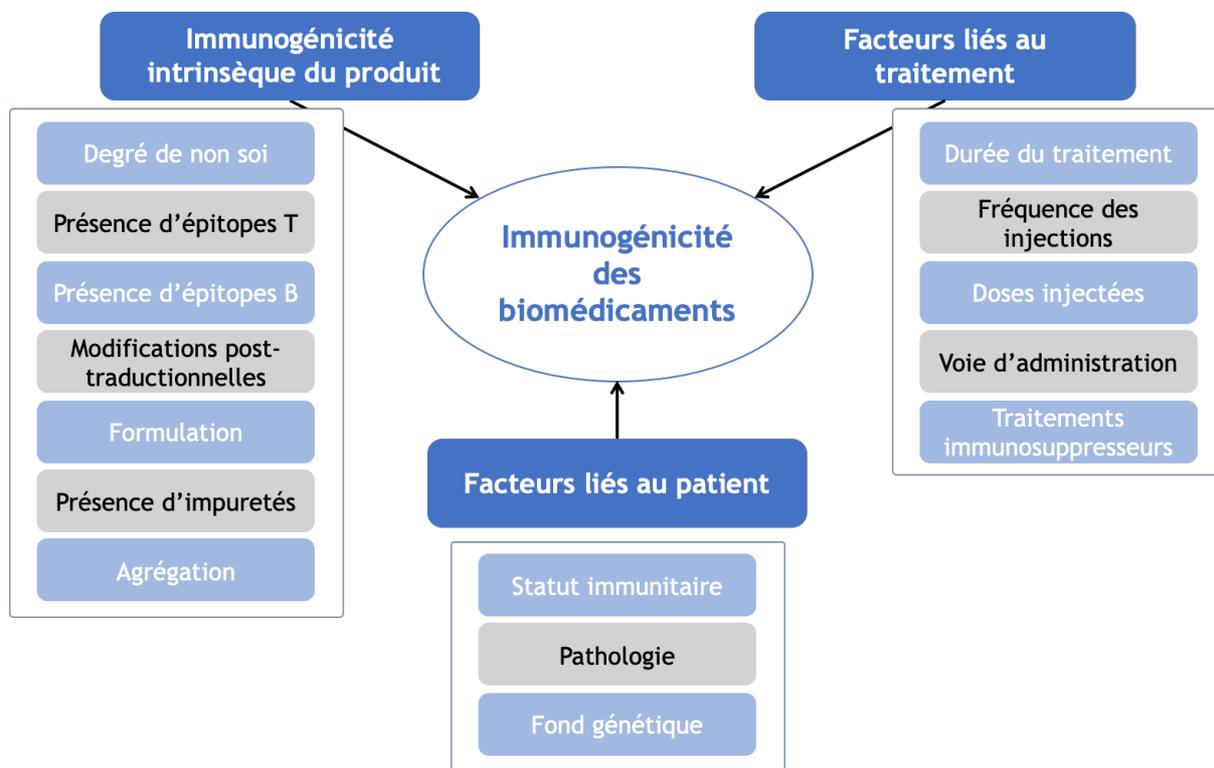


Figure 10 : Facteurs influençant l'immunogénicité des biomédicaments.

4.1. Immunogénicité intrinsèque du produit

Le degré de non-soi explique partiellement l'immunogénicité des protéines thérapeutiques, Cependant, plusieurs autres facteurs liés au produit administré jouent aussi un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire.

4.1.1. Présence d'épitopes T

Le développement d'ADA de haute affinité nécessite le déclenchement d'une réponse immunitaire dépendante des LT. Les protéines thérapeutiques doivent être internalisées et apprêtées par les CPA et les peptides ainsi formés sont présentés aux LT via les molécules du

CMH de classe II. La liaison du complexe CMH-peptide à un récepteur des LT (TCR) spécifique induit la prolifération des LT CD4⁺ nécessaires à la production des ADA. L'efficacité de l'interaction et l'intensité de la réponse dépendent de l'haploype HLA, du peptide présenté ainsi que de l'existence de LT spécifiques de ce peptide (van Schouwenburg et al., 2013). Les épitopes T immunodominants sont donc des séquences peptidiques linéaires issues des protéines thérapeutiques pouvant se lier aux molécules du CMH et pouvant être reconnues par des LT qui leur sont spécifiques.

Plusieurs études se sont ainsi intéressées à la détermination des épitopes T immunodominants qui favoriseraient l'immunogénicité des biomédicaments telles que le FVIII recombinant (Jankowski et al., 2019; Moise et al., 2012), l'IFN β (Kalluri et al., 2018), les anticorps monoclonaux (natalizumab, infliximab, rituximab ...) (Cassotta et al., 2019; Hamze et al., 2017). Des techniques *in silico* sont notamment employées pour prédire, via des algorithmes, la stabilité et l'affinité de la liaison des peptides d'une protéine thérapeutique aux molécules du CMH (Jawa et al., 2013). Toutefois, les peptides identifiés *in silico* peuvent ne pas être apprêtés et présentés par les CPA. Une technique de MAPPs (*MHC-associated peptide proteomics*) peut être alors utilisée pour déterminer les séquences peptidiques présentes sur les molécules du CMH de classe II. Une protéine thérapeutique est ainsi incubée avec des DC, et les peptides présentés sur les molécules du CMH sont ensuite isolés et les séquences d'acides aminés déterminées par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (Rombach-Riegraf et al., 2014). Les séquences peptidiques déterminées *in silico* ou par la technique de MAPPs sont validées *in vitro* afin d'évaluer la réponse T spécifique notamment via la prolifération des LT et la sécrétion de cytokines (Jawa et al., 2013). La présence de répertoire de LT CD4⁺ spécifiques de biomédicaments, tels que l'EPO, le FVIII et plusieurs anticorps monoclonaux, a été mise en évidence chez des donneurs sains (Delluc et al., 2010, 2011). Par exemple, dans le cas des anticorps monoclonaux, un modèle de co-cultures autologues de LT

CD4⁺ et de DC a permis de montrer l'existence de répertoires de LT spécifiques des différentes molécules testées, à l'exception du trastuzumab et de l'etanercept, avec une fréquence entre 0,1 à 1 LT spécifique par million de LT circulants, quel que soit le degré d'humanisation de l'anticorps. Ceci est le cas par exemple du rituximab, l'infliximab, l'adalimumab avec des fréquences de LT spécifiques de 0,35, 0,1 et 0,33 respectivement, alors que la fréquence est de 0,02 pour le trastuzumab et de 0,01 pour l'etanercept (Delluc et al., 2011). Ces résultats corrélaient avec l'immunogénicité observée en clinique (Maillère et al., 2012). De plus, dans le cas du rituximab et de l'infliximab, 9 épitopes T immunodominants ont été détectés au niveau des fragments variables grâce à l'évaluation de la réponse des LT à des peptides dérivant du rituximab ou de l'infliximab. La caractérisation de ces épitopes a montré qu'ils avaient une bonne affinité pour se lier aux molécules HLA-DR et faisaient partie des peptides présentés par les DC d'après la technique du MAPPs. Par ailleurs, deux tiers de ces épitopes identifiés chez des donneurs sains induisaient l'activation de LT de patients immunisés au rituximab ou à l'infliximab (Hamze et al., 2017). Plus récemment, Cassotta et collaborateurs ont montré la présence d'un épitope T immunodominant unique au niveau de la région FR2-CDR2 de la chaîne légère du natalizumab, favorisant la formation d'ADA neutralisant dirigés contre le natalizumab chez deux patients (Cassotta et al., 2019).

Les différentes études de prédiction et d'identification d'épitopes T qui favorisent l'immunogénicité ont donc pour objectif final de rendre les protéines thérapeutiques moins immunogènes. D'une part, il est possible de modifier les séquences peptidiques des épitopes T immunodominants en induisant des mutations spécifiques qui pourraient réduire l'affinité de leur liaison aux molécules du CMH tout en conservant l'activité biologique du biomédicament. Par exemple, dans le cas du FVIII, des épitopes T immunodominants ont été identifiés et des mutations au niveau de ces peptides ont permis de réduire la prolifération des LT de patients (Ettinger et al., 2018) et de donneurs sains (Jones et al., 2005). D'autre part, la prédiction *in*

silico des épitopes T permet d'évaluer le risque d'immunogénicité au cours des phases de sélection et de développement des candidats-médicaments (Tourdot and Hickling, 2019).

4.1.2. Présence d'épitopes B

Les épitopes B sont des séquences d'acides aminés pouvant être linéaires ou conformationnelles qui se lient aux anticorps membranaires et sécrétés. L'identification des épitopes B favorisant l'immunogénicité des biomédicaments est plus complexe que celle des épitopes T. Toutefois, la prédiction *in silico* de ces épitopes est possible grâce à divers algorithmes disponibles (Sanchez-Trincado et al., 2017). Il est également possible de cartographier les épitopes B à la surface de biomédicaments en déterminant la structure cristalline des complexes antigène-anticorps (Pratt, 2018). Par ailleurs, les épitopes peuvent être identifiés à travers l'évaluation de la fixation d'ADA sériques de patients immunisés aux différents peptides issus du biomédicament utilisé. Ainsi, deux études par Homann et collaborateurs ont permis l'identification d'épitopes B notamment au niveau des fragments variables de l'infliximab et de l'adalimumab (Homann et al., 2015, 2017). Les épitopes ont été identifiés grâce à l'interaction d'IgG anti-infliximab ou d'IgG anti-adalimumab sériques avec séquences peptidiques issues de l'infliximab ou de l'adalimumab. Pour l'infliximab, 4 épitopes ont été identifiés au niveau ou à proximité du paratope et 2 autres épitopes ont été identifiés au niveau du fragment constant (Homann et al., 2015). Dans le cas de l'adalimumab, 4 épitopes ont été identifiés au niveau du paratope et un épitope au niveau du fragment constant (Homann et al., 2017). Ces résultats sont en accord avec la présence d'ADA à 90 % neutralisants pour l'infliximab et à plus de 97 % pour l'adalimumab (van Schie et al., 2015). Par ailleurs, il a été montré que dans le cas du FVIII, les ADA sont notamment dirigés contre les domaines A2, C1 et C2 de la protéine qui comprendraient les épitopes B spécifiques (Kahle et al., 2017).

4.1.3. Modifications structurales post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles peuvent influencer les propriétés biologiques et physico-chimiques des protéines thérapeutiques. La glycosylation et la pégylation sont les modifications les plus communes et elles peuvent, dans certains cas, réduire l'immunogénicité du biomédicament, et dans d'autres, en être responsables.

La glycosylation peut différer d'une protéine à l'autre en termes de séquence des glycanes, longueur de chaîne et position du site de branchement en fonction du type de cellules hôtes utilisées pour la production. Ceci peut alors aboutir à des variabilités par rapport aux protéines endogènes. La présence de chaînes glycosylées permet d'une part de moduler l'activité et la demi-vie de la protéine thérapeutique et d'autre part de maintenir sa stabilité en assurant un repliement correct et le masquage de régions hydrophobes. Ainsi, l'absence de glycosylation pourrait exposer des épitopes immunogènes et favoriser ainsi la formation d'ADA. C'est ce qui a été observé avec le GM-CSF recombinant humain (rhGM-CSF pour *recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Le rhGM-CSF glycosylé produit en cellules CHO (*chinese hamster ovary cells*) était moins immunogène que le rhGM-CSF produit chez les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) ou dans la levure. En effet, les ADA étaient dirigés contre des épitopes initialement masqués par des O-glycosylations pour le rhGM-CSF produit en cellules CHO et le GM-CSF endogène, mais qui sont démasqués pour le rhGM-CSF produit dans *E. coli* et la levure (Gribben et al., 1990). Dans d'autres cas, la présence de glycoformes d'origine murine peut favoriser la mise en place de réponse immunitaire. Ceci a notamment été observé dans le cas du cetuximab produit par une lignée cellulaire murine et comprenant du galactose α -1,3 galactose (α -Gal) au niveau de ses fragments Fab (figure 9). Toutefois, l'immunogénicité de cet anticorps a été réduite lorsqu'il a été produit en cellules CHO qui ne produisent pas d' α -1,3-galactosyltransférase nécessaire pour l'ajout d' α -Gal sur le site de glycosylation (Chung et al., 2008).

La pégylation, ou ajout d'un groupement de polyéthylène glycol (PEG), permet d'augmenter la demi-vie des protéines thérapeutiques et ainsi réduire sa fréquence d'administration. Ceci est le cas du certolizumab pegol, qui est un anti-TNF α formé d'un fragment Fab humanisé lié à un groupement PEG. La pégylation peut, comme la glycosylation, masquer des épitopes immunogènes ou des régions hydrophobes et donc réduire l'immunogénicité du biomédicament (Veronese and Mero, 2008). Cependant, l'existence d'anticorps anti-PEG chez des individus sains et traités responsables de la perte d'efficacité de la protéine thérapeutique et d'effets secondaires indésirables ont été montrés ; ceci est le cas de l'asparaginase pegylée, utilisée pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aigue (Armstrong et al., 2007; Liu et al., 2011).

4.1.4. Formulation

Les composés entrant dans la formulation d'un biomédicament sont sélectionnés pour leur capacité à maintenir la stabilité de la protéine. Pour cela, la composition doit prendre en compte les propriétés physico-chimiques de la protéine thérapeutique et des excipients ainsi que l'interaction de la protéine avec les excipients et le matériau d'emballage primaire. La formulation vise donc à minimiser le risque d'immunogénicité en prévenant la perte de conformation native de la protéine soit par dénaturation, dégradation chimique, fragmentation ou encore agrégation. Le PS80 et l'albumine humaine (HSA pour *human serum albumin*) sont les deux excipients les plus décrits comme pouvant être impliqués dans l'immunogénicité des biomédicaments.

Le rôle du PS80 dans l'immunogénicité a été proposé dans les cas de PRCA avec l'Epex[®], l'incidence de ces cas étant associée au changement de formulation par substitution de la HSA par le PS80. Le PS80 pourrait interagir avec le caoutchouc des bouchons non enrobés des seringues pré-remplies et induire leur dégradation. En effet, il a été montré que la formation de produits de dégradation n'avait pas lieu si le PS80 était utilisé dans des seringues pré-remplies

avec bouchons enrobés ou si la HSA était utilisée en présence de bouchons non enrobés. Les produits de dégradation pourraient donc agir comme signal de danger et favoriser la mise en place d'une réponse immunitaire (Boven et al., 2005).

L'utilisation de la HSA pour ses propriétés stabilisantes dans une formulation de l'IFN α -2a a été comparée à d'autres formulations pour étudier son impact sur l'immunogénicité et il s'est avéré que la formulation contenant la HSA était la plus immunogène. En effet, le stockage du produit à température ambiante induisait une oxydation partielle de la HSA qui formait des agrégats avec l'IFN α -2a ou les autres molécules de HSA, favorisant l'immunogénicité du produit. Une formulation dépourvue de HSA et la conservation du produit à 4°C a permis de réduire l'immunogénicité de l'IFN α -2a (Schellekens, 2005).

4.1.5. Présence d'impuretés

Les impuretés pouvant être retrouvées dans le produit sont notamment issues de la protéine thérapeutique elle-même (dénaturée, agrégée, tronquée, mal repliée...), de la cellule hôte (protéines, lipides, acides nucléiques...) ou du matériel utilisé dans le procédé de fabrication et de conservation du produit (résine des colonnes de chromatographie, produits de dégradation). Ces impuretés peuvent avoir un effet adjuvant et favoriser le déclenchement d'une réponse immunitaire. Cependant la présence des impuretés dans les préparations est rigoureusement contrôlée au cours de la phase de production industrielle afin de réduire leur impact sur la qualité du produit. Par exemple, la présence de taux élevés de protéines issues de la cellule hôte *E. coli* a été incriminée dans l'immunogénicité de la somatropine recombinante humaine (GH pour growth hormone) observée chez près de 60 % des patients traités. L'amélioration de la phase de purification du produit a permis de réduire le taux d'ADA produits (Singh, 2011).

4.1.6. Agrégation

L'agrégation des protéines thérapeutiques pourrait favoriser le déclenchement d'une réponse immunitaire (Moussa et al., 2016a). Un exemple historique est celui corrélant la présence d'agrégats dans les préparations de somatropine recombinante humaine au développement d'ADA chez près de 50 % des enfants traités. En effet, les patients développant des ADA persistants avaient reçu des préparations contenant 50 à 70 % de protéines agrégées, alors que les patients recevant des préparations avec moins de 5 % d'agrégats avaient développé des ADA transitoires (Moore and Leppert, 1980).

La formation d'agrégats d'anticorps thérapeutiques ainsi que leur rôle dans l'immunogénicité sera décrit plus en détails dans le chapitre 2.

4.2. Facteurs liés au patient

Plusieurs paramètres inhérents au patient constituent des facteurs de risque au développement d'ADA. Ils sont principalement en rapport avec son statut immunitaire, sa pathologie ainsi que son fond génétique.

4.2.1. Statut immunitaire et pathologie

De manière générale, le développement des ADA semble moins important chez les patients immunodéprimés à cause d'une pathologie comme un cancer ou bien à cause d'un traitement concomitant avec des immunosuppresseurs par rapport aux patients ayant un système immunitaire performant. Par contre, les patients souffrant d'infections chroniques ou de maladies inflammatoires actives sont plus susceptibles à développer des ADA. C'est le cas du rituximab qui est utilisé dans le traitement du lymphome malin non Hodgkinien, mais aussi en deuxième ligne dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde après échec au traitement de fond (dont au moins un anti-TNF α) et dans le traitement de la sclérose en plaque. En effet, le

statut immunitaire dicté par la pathologie traitée joue un rôle non négligeable dans l'immunogénicité : seulement 1 % des patients traités par le rituximab pour un lymphome malin non Hodgkinien développent des ADA (Maloney et al., 1997) contre 11,5 % des patients traités pour une polyarthrite rhumatoïde (Einarsson et al., 2017), 26 à 37 % dans le cas d'une sclérose en plaque (Dunn et al., 2018) et 47,4 % pour le lupus érythémateux disséminé (Faustini et al., 2018). Par ailleurs, Einarsson et collaborateurs ont montré qu'un score élevé de l'activité de la polyarthrite rhumatoïde (DAS28) ainsi qu'une durée plus longue de la maladie sont associés à un risque plus important de développement d'ADA contre le rituximab (Einarsson et al., 2017). Cette observation a également été faite dans le cas de l'adalimumab (Bartelds et al., 2011; Quistrebert et al., 2018).

4.2.2. Fond génétique et prédisposition à l'immunisation

Les facteurs génétiques semblent également participer à la modulation de la réponse immunitaire contre les biomédicaments. Plusieurs études ont montré une corrélation entre certains haplotypes du CMH et le développement d'ADA, comme par exemple les cas de PRCA chez les patients traités à l'EPO et l'haplotype HLA-DRB1*09-DQB1*0309 (Praditpornsilpa et al., 2009), ou bien la production de taux élevés d'ADA neutralisants chez les patients atteints de sclérose en plaque traités avec l'IFN β -1a et d'haplotype HLA-DRB1*15 ou traités avec l'IFN β -1b et d'haplotype HLA-DRB1*0401 (Link et al., 2014). Par contre, chez ces patients traités avec de l'IFN β -1a, il a été montré que la présence de l'haplotype HLA-DQA1*05 diminuait le risque de produire des taux élevés d'ADA neutralisants (Link et al., 2014). Chez les patients traités avec les anti-TNF α , il a été montré que les haplotypes HLA-DR β -11, HLA-DQ03 et HLA-DQ05 sont associés au développement d'ADA dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (Benucci et al., 2018) alors que les allèles HLA-DRB1*03 et HLA-DRQA1*05 sont les plus répandus dans le cas de la maladie de Crohn avec l'infliximab et l'adalimumab

(Billiet et al., 2015; Liu et al., 2018; Sazonovs et al., 2019). Certains polymorphismes génétiques ont également été mis en cause dans l'immunogénicité des biomédicaments. Une étude a montré que la présence d'un polymorphisme dans le promoteur du gène codant pour l'*il-10* est associée à une augmentation de la fréquence de développement d'ADA dirigés contre l'adalimumab dans la polyarthrite rhumatoïde (Bartelds et al., 2009). Ce même polymorphisme ainsi que des polymorphismes dans les promoteurs des gènes codants pour le TNF α , l'hème oxygène-1 et le CTLA-4 favorisent le développement d'ADA chez les patients hémophiles sous FVIII (Gouw and van den Berg, 2009; Repessé et al., 2013). Toujours dans le cas de l'hémophilie A, il est important de rappeler que plus le déficit en FVIII est important, plus le risque de développer des ADA dirigés contre la protéine administrée est augmenté (Delignat et al., 2018).

4.3. Facteurs liés au traitement

Chaque variable de la stratégie du traitement par biomédicaments peut jouer un rôle dans le développement des ADA. Les paramètres les plus décrits dans la littérature sont la durée et la fréquence du traitement, les doses injectées et la voie d'administration.

4.3.1. Durée, fréquence et doses injectées

De manière générale, les traitements longs sont considérés plus immunogènes que les thérapies de courte durée (Schellekens, 2002). Une étude récente sur l'immunogénicité de l'infliximab et de l'adalimumab a montré que l'incidence d'ADA continuait à augmenter avec le temps même après 18 mois de traitement de patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde (Quistrebert et al., 2018).

Il semble également que les traitements intermittents et les interruptions temporaires de la thérapie favoriseraient le développement d'ADA (Jahn and Schneider, 2009). Par exemple,

dans le cas des patients souffrant de maladie de Crohn et traités par l'infliximab, les groupes de patients sous traitement de fond bénéficient d'un plus faible taux d'ADA ainsi que d'un meilleur taux de rémission que les groupes de patients suivants un traitement intermittent (Hanauer et al., 2004). Cependant, une fréquence élevée d'administration du biomédicament pourrait favoriser l'immunogénicité comme dans le cas de l'IFN β qui est plus immunogène si administré une fois par semaine que toutes les 3 semaines (Ross et al., 2000).

L'influence de la dose de médicament administré dans l'immunogénicité n'est pas très claire. Des études montrent que l'utilisation de doses élevées de biomédicaments permet de réduire le taux d'ADA en favorisant une tolérance vis-à-vis de la protéine thérapeutique et que l'augmentation de la dose en cas de perte de réponse permet d'améliorer la réponse clinique (Ma et al., 2014; Maini et al., 1998; Papamichael et al., 2018). Toutefois, il est possible que cette observation soit due à l'interférence de la protéine thérapeutique dans le test de détection des ADA (Chaigne and Watier, 2015).

4.3.2. Voies d'administration

Trois voies d'administration (IV, SC et IM) sont utilisées pour l'injection des biomédicaments. Les voies SC et IM deviennent de plus en plus privilégiées pour une meilleure observance du traitement et un confort supérieur pour le patient. Dans cette perspective, il est important de mettre en évidence l'impact de la voie d'administration sur le potentiel immunogène du biomédicament. Néanmoins, il est difficile de comparer les voies entre elles pour un même biomédicament, étant donné que très peu de protéines thérapeutiques peuvent être administrées par 2 voies différentes. Certaines études suggèrent que les voies SC et IM sont plus immunogènes que la voie IV alors que d'autres ne trouvent pas de différence entre les voies d'administration. Il semble donc que l'impact de la voie sur l'immunogénicité dépendrait plutôt du produit administré (Hamuro et al., 2017). Une étude a montré que l'injection du FVIII par

voie SC favorise plus le développement d'ADA que la voie IV (Peng et al., 2009). Une différence est également observée dans le cas de l'IFN β -1a où l'administration par voie SC induit la formation d'ADA chez 11 à 23 % des patients alors que l'administration par voie IM semble moins immunogène avec 1 à 4,2 % des patients développant des ADA (Bachelet et al., 2016). Toutefois, d'autres études avec le rituximab, l'abatacept, le golimumab et le trastuzumab n'ont pas montré de différence d'impact sur l'immunogénicité entre les voies SC et IV (Davies et al., 2017; Genovese et al., 2011; Hamuro et al., 2017; Jackisch et al., 2019).

4.3.3. Traitements immunosuppresseurs

L'administration concomitante d'immunosuppresseurs s'est avérée bénéfique sur l'immunogénicité des anticorps anti-TNF α (Garcês et al., 2013) et plus récemment du rituximab (Einarsson et al., 2017). Plusieurs études ont montré l'efficacité du méthotrexate dans la réduction des taux d'ADA chez les patients qu'ils soient traités avec l'infliximab (Ben-Horin et al., 2013; Dénarié et al., 2017; Vermeire et al., 2007), l'adalimumab (l'Ami et al., 2017; Bartelds et al., 2007; Krieckaert et al., 2012) ou le golimumab (Wang et al., 2018). La plupart des études s'intéressant au traitement concomitant de certolizumab pegol et de méthotrexate montrent l'efficacité supérieure de cette association par rapport au méthotrexate seul (Emery et al., 2017; Smolen et al., 2009). Le mécanisme par lequel le méthotrexate favorise une réduction du taux d'ADA en réponse aux anti-TNF α n'est toujours pas bien défini, mais les hypothèses émises suggèrent d'une part que le méthotrexate, en tant qu'immunomodulateur, inhibe l'expansion des LT et B et d'autre part qu'il réduit l'inflammation de façon synergique avec l'anti-TNF α (Friedman and Cronstein, 2019). De plus, Bitoun et collaborateurs ont récemment montré que le rôle du méthotrexate dans la réduction de l'immunogénicité serait lié à son interaction avec la cytokine BAFF (*B-cell activating factor*) qui peut favoriser l'activation des LB régulateurs et la sécrétion d'IL-10. Cette étude a permis de mettre en évidence une

corrélation entre un taux sérique élevé de BAFF et l'absence d'ADA chez les patients, uniquement en cas de traitement concomitant de méthotrexate et d'anticorps anti-TNF α . (Bitoun et al., 2018).

Chapitre II : Agrégation des anticorps thérapeutiques et immunogénicité

1. Définition de l'agrégation

L'agrégation correspond au processus d'auto-association de protéines monomériques entre elles pour former des particules de taille supérieure au monomère. Un agrégat protéique est donc toute espèce multimérique pouvant se former à partir de la protéine thérapeutique à tout moment au cours de la formulation, le transport, la conservation et la manipulation du produit (Wang and Roberts, 2018).

Les agrégats peuvent différer entre eux selon la taille, la réversibilité, la conformation, les modifications des liaisons covalentes et la morphologie. Le critère le plus communément employé pour classer les agrégats est celui de la taille. Le tableau 4 résume la classification des agrégats adoptée suite au *Protein Aggregation and Immunogenicity meeting* de l'American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) en 2010 (Narhi et al., 2012).

Tableau 4 : Classification des agrégats selon leur taille.

Taille	Terminologie adoptée	Caractéristiques
< 100 nm	Agrégats nanométriques	Oligomères, solubles
100 - 1000 nm	Agrégats submicrométriques	Solubles
1 - 100 µm	Agrégats micrométriques	Particules subvisibles, insolubles
> 100 µm	Agrégats de taille supérieure à 100 µm	Particules visibles, insolubles

Adapté de (Narhi et al., 2012)

2. Formation des agrégats

2.1. Mécanismes de formation des agrégats

L'agrégation correspond à une série d'évènements favorisant les interactions protéine-protéine pour conduire d'abord à la formation de dimères ou d'oligomères, ensuite à la polymérisation

et l'augmentation de la taille de l'agrégat pour finalement former des particules subvisibles ou visibles (Wang and Roberts, 2018).

Les protéines peuvent subir des modifications structurelles, souvent des dépliements partiels ou totaux, qui aboutissent à l'exposition de séquences ou régions hydrophobes favorables à l'agrégation (APR pour *aggregation-prone regions*) ou « hot spot(s) », favorisant ainsi le contact entre les protéines et la formation de dimères puis d'oligomères. La protéine sous forme partiellement ou totalement dépliée a ainsi une tendance plus importante à exposer ses régions hydrophobes que si elle est sous forme native. Cependant, certaines protéines peuvent spontanément s'agréger sous leur forme native sans passer par un état intermédiaire dénaturé grâce à des interactions électrostatiques et/ou hydrophobes rapprochant les monomères natifs pour former un cluster. Il est également connu que les interactions entre protéines dépendent de leur concentration dans la solution, des concentrations protéiques élevées favorisant la formation d'agrégats en réduisant l'espace entre les monomères (Roberts, 2014; Wang and Roberts, 2018).

Les premières interactions entre les protéines, natives ou dépliées, sont souvent réversibles avec des liaisons faibles (interactions électrostatiques, hydrophobes, ponts hydrogène, forces de van der Waals) et peuvent être facilement dissociées par dilution de la solution ou par retour à des conditions physico-chimiques favorables à la stabilité des monomères (pH, température...). Toutefois, les agrégats réversibles peuvent potentiellement induire la formation d'un agrégat irréversible, qualifié de noyau initiateur. Les liaisons responsables des interactions dans un agrégat irréversible peuvent être covalentes (souvent des ponts disulfure) ou non covalentes (Mahler et al., 2009).

Les agrégats produits initialement, qu'ils soient réversibles ou non, sont solubles. Cependant, la formation du noyau est suivie d'une phase de croissance de l'agrégat par association de

plusieurs agrégats et/ou par addition de monomères aux agrégats aboutissant à la formation d'agrégats insolubles (Narhi et al., 2012; Wang and Roberts, 2018).

La figure 11 représente les mécanismes de formation d'agrégats protéiques en solution. Finalement, le mécanisme exact aboutissant à la formation d'un agrégat reste difficile à déterminer car il dépend largement de la structure protéique, de l'étape d'agrégation, des conditions physico-chimiques de la solution ainsi que de la coexistence de plusieurs mécanismes d'agrégation pour une protéine donnée (Wang and Roberts, 2018).

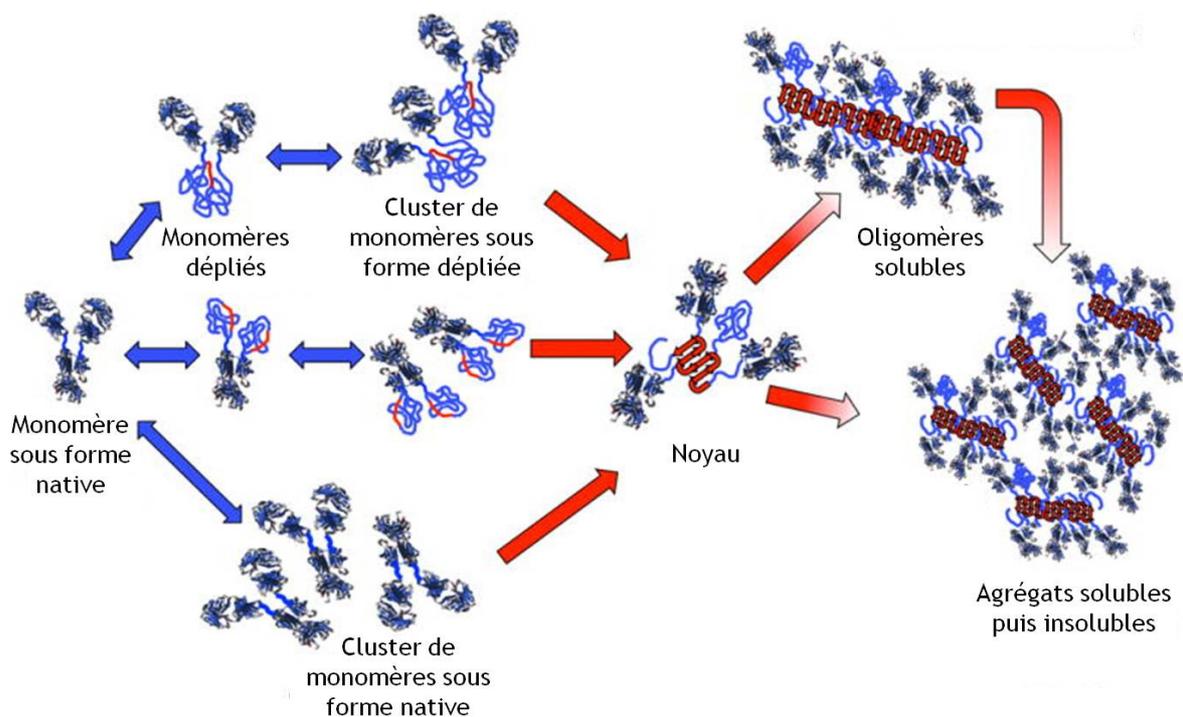


Figure 11 : Mécanisme de la formation d'agrégats.

Adapté de (Roberts, 2014)

Les monomères sous forme native ou dépliée peuvent interagir entre eux formant des clusters ou agrégats réversibles, les flèches bleues représentant la réversibilité des interactions. Les interactions entre les monomères dépliés sont favorisées par l'exposition d'APR représentées par les séquences rouges. À partir de la formation du noyau, les interactions deviennent irréversibles (flèches rouges) et conduisent à la polymérisation des agrégats et la formation d'agrégats qui augmentent en taille et deviennent insolubles (Roberts, 2014).

2.2. Facteurs favorisant l'agrégation

La formation d'agrégats est influencée par différents facteurs intrinsèques à la protéine et extrinsèques, qui contribuent à la perte de la stabilité de la protéine au cours des différentes étapes de la vie du produit (production, purification, transport, stockage, administration...).

2.2.1. Structure de la protéine

L'exposition des séquences peptidiques hydrophobes formant les APR favorise l'agrégation. Les APR sont présentes dans différentes régions de la protéine, essentiellement au niveau des CDR comme par exemple le CDR1 (Perchiacca et al., 2011), la chaîne lourde du CDR2 (Wang et al., 2010) ainsi que les fragments Fab et Fc et les domaines CH2 et CH3 des anticorps monoclonaux (Wang and Roberts, 2018). Il a ainsi été proposé d'apporter des modifications aux séquences peptidiques des « hot spots » pour réduire l'agrégation des protéines ce qui a été possible par des mutations modifiant certains acides aminés ; les APR pouvant être identifiés par des technologies telles que la SAP (pour spatial aggregation propensity) (Chennamsetty et al., 2009). Toutefois, cette stratégie reste difficile à appliquer car les APR présentes au niveau des CDR des anticorps sont souvent impliquées dans la reconnaissance de l'antigène et la modification d'un seul acide aminé pourrait influencer et réduire l'activité de la protéine (Wang et al., 2010).

La glycosylation joue un rôle important dans la stabilité des protéines en camouflant les régions hydrophobes. Il a été montré que la glycosylation au niveau du domaine CH2 favorise la stabilité d'un anticorps en réduisant l'exposition des APR, alors que la forme non glycosylée du même anticorps est plus sensible à l'agrégation induite par des températures élevées ou un pH acide (Hari et al., 2010; Kayser et al., 2011).

Les structures secondaires et tertiaires jouent également un rôle dans la stabilité des protéines. D'une part, une étude a montré une corrélation entre le pourcentage de feuillets β des protéines

sous forme native et l'agrégation induite par la lyophilisation (Roughton et al., 2013). De plus, l'agrégation est favorisée et stabilisée par la formation de feuillets β impliquant les acides aminés de différents monomères (Roberts, 2014; Wu et al., 2014). D'autre part, le camouflage des APR par la structure tertiaire de la protéine permet de réduire le risque d'agrégation et donc des modifications de cette structure exposant les APR pourraient, à l'inverse, favoriser l'agrégation (Wang and Roberts, 2018).

2.2.2. Dégradation chimique

Les protéines peuvent subir des dégradations chimiques au cours des différents étapes de leur production et purification qui favoriseraient leur agrégation par exposition des surfaces hydrophobes, par augmentations des interactions entre les protéines ou par réduction de la stabilité conformationnelle de la protéine. Des mécanismes tels que l'oxydation, la déamidation, l'hydrolyse et la glycation ont été décrits comme augmentant la capacité d'agrégation des protéines. Par exemple, l'oxydation des méthionines ou la formation ou échange de ponts disulfure peuvent avoir lieu en présence de métaux (comme l'acier inoxydable des réservoirs dédiés à la conservation intermédiaire des produits) ou d'agents oxydants (comme le peroxyde d'hydrogène) ou encore par exposition à la lumière, favorisant ainsi la formation d'agrégats (Mahler et al., 2009; Wang and Roberts, 2018).

2.2.3. Concentration protéique

Comme indiqué précédemment, des concentrations élevées en protéines favorisent une formation plus rapide d'agrégats en réduisant les distances séparant les monomères, augmentant ainsi leurs interactions. Par exemple, durant l'étape de production de certains anticorps monoclonaux par culture cellulaire, l'accumulation de grandes quantités de protéines dans les cellules ainsi que dans le milieu de culture peut favoriser l'agrégation des protéines, les taux

d'agrégats pouvant aller jusqu'à 30 % (Kramarczyk et al., 2008). Une diminution de la concentration protéique par dilution réduit non seulement le processus de formation d'agrégats mais également la quantité d'agrégats réversibles préalablement formés (Mahler et al., 2009; Vázquez-Rey and Lang, 2011; Wang and Roberts, 2018).

2.2.4. Formulation

Tout changement dans les conditions physico-chimiques de la solution peut avoir un impact sur la capacité de la protéine à s'agréger. Ces changements concernent notamment le pH et les excipients (Wang and Roberts, 2018).

L'altération du pH de la solution a un effet sur la stabilité conformationnelle et colloïdale des protéines. En effet, le pH détermine le type et la distribution des charges de surface de la protéine, affectant ainsi les interactions intra- et intermoléculaires. Par exemple, une étude a montré que l'exposition d'une IgG1 à un pH acide de 1 induit des modifications à la structure tertiaire de l'anticorps favorisant l'exposition de séquences hydrophobes. La conservation des monomères préalablement exposés au pH acide pendant quelques heures à 4°C a permis de détecter la formation d'agrégats de taille variant du dimère aux particules de 10 µm (Filipe et al., 2012a).

Différents excipients peuvent être rajoutés à la formulation pour augmenter la stabilité de la protéine, ce qui est le cas du polysorbate. Cependant, il s'est avéré que le rôle de ce surfactant dans la stabilité de la protéine dépend du ratio protéine / surfactant. Par exemple, il a été montré qu'une concentration élevée (1 %) de PS80 pouvait favoriser son auto-oxydation et la formation d'hydroperoxyde. Ces résidus peroxyde sont responsables de l'oxydation des IgG1 en solution, réduisant ainsi leur stabilité et augmentant leur sensibilité à l'agrégation si elles sont de plus exposées à la lumière ou à un stress de température (Agarkhed et al., 2012). Toutefois, l'utilisation du PS80 à faible concentration (environ 0,005 %) pouvait protéger les anticorps de

l'agrégation induite par un stress mécanique en réduisant par compétition leur adsorption à l'interface air/liquide (Agarkhed et al., 2018).

2.2.5. Température

Une variation de la température peut aussi avoir une influence sur l'agrégation des protéines en favorisant leur dégradation chimique et réduisant leur stabilité conformationnelle.

La température de fusion d'une protéine varie généralement entre 40 et 80°C et correspond à la température à laquelle 50 % des protéines en solution sont dépliées. Ainsi, des températures élevées et supérieures à la température de fusion accélèrent le processus d'agrégation en favorisant le dépliement des protéines (Mahler et al., 2009; Rosa et al., 2017). De plus il a été montré que durant la phase de production, la conservation d'un anticorps monoclonal dans du milieu de culture à 37°C favorisait son agrégation (Cromwell et al., 2006).

Par ailleurs, il a été plus récemment montré que les températures basses peuvent aussi favoriser la formation d'agrégats en augmentant les interactions entre les protéines et leur dépliement (Rosa et al., 2017; Wang and Roberts, 2018).

2.2.6. Agitation

L'agitation que subit un biomédicament peut avoir lieu lors des différentes étapes de production (notamment au cours de l'homogénéisation des cultures cellulaires en bioréacteurs et des protéines pendant l'étape de purification) et de transport du produit (Vázquez-Rey and Lang, 2011). Le stress d'agitation peut induire l'agrégation des protéines notamment en favorisant leur dépliement et leur adsorption, en les exposant à des forces de cisaillement et des frottements et en augmentant leur présence à l'interface air/liquide.

Par exemple, une étude a montré que l'agrégation d'un anticorps monoclonal est favorisée par la pression et les frottements que subit l'anticorps entre le barreau d'agitation et le flacon en verre (Sediq et al., 2016; Wang and Roberts, 2018).

2.2.7. Congélation et décongélation

La congélation est une étape nécessaire au cours de la fabrication pour maintenir la stabilité et l'activité des biomédicaments, notamment avant la mise en conteneur final et avant le regroupement des lots intermédiaires en un lot final (Vázquez-Rey and Lang, 2011). Cependant, la congélation favorise la dénaturation et l'agrégation des protéines en induisant des perturbations physico-chimiques de la solution protéique : adsorption, concentration de la protéines, cristallisation de certains composés.

Les étapes de congélation et décongélation peuvent augmenter la capacité de la protéine à s'agréger notamment durant la phase de stockage (Liu et al., 2014; Wang and Roberts, 2018). Par exemple, l'étude de l'effet des étapes de congélation et décongélation sur l'agrégation d'un anticorps monoclonal IgG2 a montré la détection d'agrégats de taille variant entre 0,5 et 25 μm après décongélation (Kueltzo et al., 2008).

2.2.8. Lumière

L'exposition d'une protéine à la lumière, visible ou ultraviolette (UV), peut également avoir des conséquences sur sa stabilité en augmentant notamment l'oxydation de certains résidus (méthionine, tryptophane...) et donc favorisant son agrégation (Wang and Roberts, 2018).

Ceci a été montré dans le cas d'anticorps monoclonaux exposés à la lumière UV et pour lesquels il a été observé une réduction de la fraction de monomères et la formation de dimères et d'oligomères (Agarkhed et al., 2012; Bommana et al., 2018).

2.2.9. Pompage

Le stress de pompage peut également favoriser la formation d'agrégats par plusieurs mécanismes tels que la formation de bulles d'air et de cavitations responsables de turbulences et d'augmentation transitoire de la température, les forces de cisaillement et l'augmentation de l'interface air/liquide responsable de l'exposition de résidus hydrophobes et des interactions entre protéines. Ceci est notamment observé au cours de l'étape d'ultrafiltration des protéines nécessaire pour modifier le tampon d'une protéine et augmenter sa concentration. En effet, l'ultrafiltration nécessite plus de 50 passages de la solution à travers la pompe ce qui expose la protéine aux différents stress physiques dus aux pompes (Vázquez-Rey and Lang, 2011; Wang and Roberts, 2018).

2.3. Méthodes de caractérisation des agrégats

Comme précédemment décrit, l'agrégation des protéines peut induire la formation d'agrégats de la taille du dimère allant aux agrégats visibles et insolubles de taille supérieure à 100 μm . Pour cela, la caractérisation des agrégats nécessite l'utilisation de méthodes orthogonales permettant de balayer un large spectre de taille ainsi que de déterminer les propriétés physico-chimiques des agrégats.

Chacune des techniques développées pour la caractérisation des agrégats présente des avantages et des inconvénients ainsi que des spectres de tailles bien définis. Le tableau 5 détaille le principe et les spécificités de chaque technique qu'elle soit utilisée pour la quantification, l'estimation de taille ou de la forme ou encore la détermination des propriétés physico-chimiques des agrégats. La figure 12 représente les différentes techniques proposées pour la quantification et/ou l'estimation de taille des agrégats selon le spectre de taille qu'elles peuvent détecter.

Tableau 5 : Les différentes méthodes de caractérisation des agrégats.

Méthode	Principe	Spectre de tailles détectées	Taille	Morphologie	Quantification
Quantification et/ou estimation de la taille et de la forme des agrégats solubles					
SDS-PAGE <small>(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)</small>	Électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes et réductrices → Poids moléculaire et liaisons (covalente ou non formant les agrégats)	0,4 - 40 nm (5 - 500 kDa)	X	-	-
Size Exclusion Chromatography	Séparation des particules sur colonne selon leur taille pour déterminer pour chaque pic l'aire sous la courbe et le temps de rétention → Taille et pourcentage de monomères restant et d'oligomères formés	0,5 - 40 à 150 nm (limite supérieure selon la colonne)	X	-	X
Taylor Dispersion Analysis	Mesure de la dispersion des particules sous flux laminaire à travers un tube capillaire → Calcul du rayon hydrodynamique	0,2 nm - 100 nm	X	-	-
Dynamic Light Scattering	Mesure du mouvement Brownien des particules en suspension : plus la particule est volumineuse, plus son mouvement Brownien sera lent → Diamètre hydrodynamique et distribution de taille des particules	0,3 nm - 10 µm	X	-	-
Nanoparticle Tracking Analysis	Visualisation des particules couplée à la mesure du mouvement Brownien des particules en suspension → Diamètre hydrodynamique et distribution de taille des particules	30 nm - 1 µm	X	X	Semi-quantitative
Quantification et/ou estimation de la taille et de la forme des agrégats insolubles					
Resistive Pulse Sensing	Mesure des changements transitoires du courant électrique → Comptage des particules et détermination de leur taille	100 nm - 1 µm	X	-	X
Quantitative Laser Diffraction	Mesure de l'intensité de la lumière diffractée par les particules en suspension à différents angles → Distribution de taille et concentration des particules	200 nm - 10 µm	X	-	X
Resonant Mass Measurement	Mesure de la fréquence de résonance qui permet de déduire la masse flottante → Calcul de la taille de la particule et de sa concentration	50 nm - 5 µm	X	-	X
Holographic video microscopy	Mesure du diamètre et de l'index de réfraction de chaque particule à partir d'un hologramme formé par les rayons diffractés et incidents de la particule illuminée par un faisceau laser	500 nm - 10 µm	X	-	X
Light obscuration	Blocage de la lumière par les particules en suspension en fonction de leur volume : détection de la lumière résiduelle	1 - 600 µm	X	-	X
Flow-Imaging Microscopy	Visualisation des particules injectées dans la cellule à flux et illuminées par une caméra.	1 µm - 400 µm	X	X	X
Light microscopy	Visualisation des particules par microscopie	1 µm - mm	X	X	-
Visual inspection	Détecter la présence d'agrégats visibles	≥ 100 µm	-	-	-
Estimation de la taille et de la forme des agrégats solubles et insolubles					
Electron microscopy	Visualisation des particules en 3 dimensions	0,1 nm - mm	X	X	-
Analyse structurale des agrégats					
Raman spectroscopy	Mesure des changements de fréquence de la lumière diffusée après contact avec les particules en suspension. Chaque mesure donne des informations sur la structure des particules étudiées	-	Structure secondaire		
Fluorescence spectroscopy	Détection des signaux de fluorescence émis soit par les résidus composant la protéine soit après excitation	-	Structure tertiaire et quaternaire		
Circular dichroism	Différence d'absorption entre la lumière polarisée gauche et droite due à l'asymétrie de la protéine : spectre d'absorption spécifique pour chaque type de structure (hélice α , feuillet β), groupement aromatique...	-	Structure secondaire, tertiaire et quaternaire		

Adapté de (Engelsman et al., 2010; Mahler et al., 2009; Wang and Roberts, 2018)

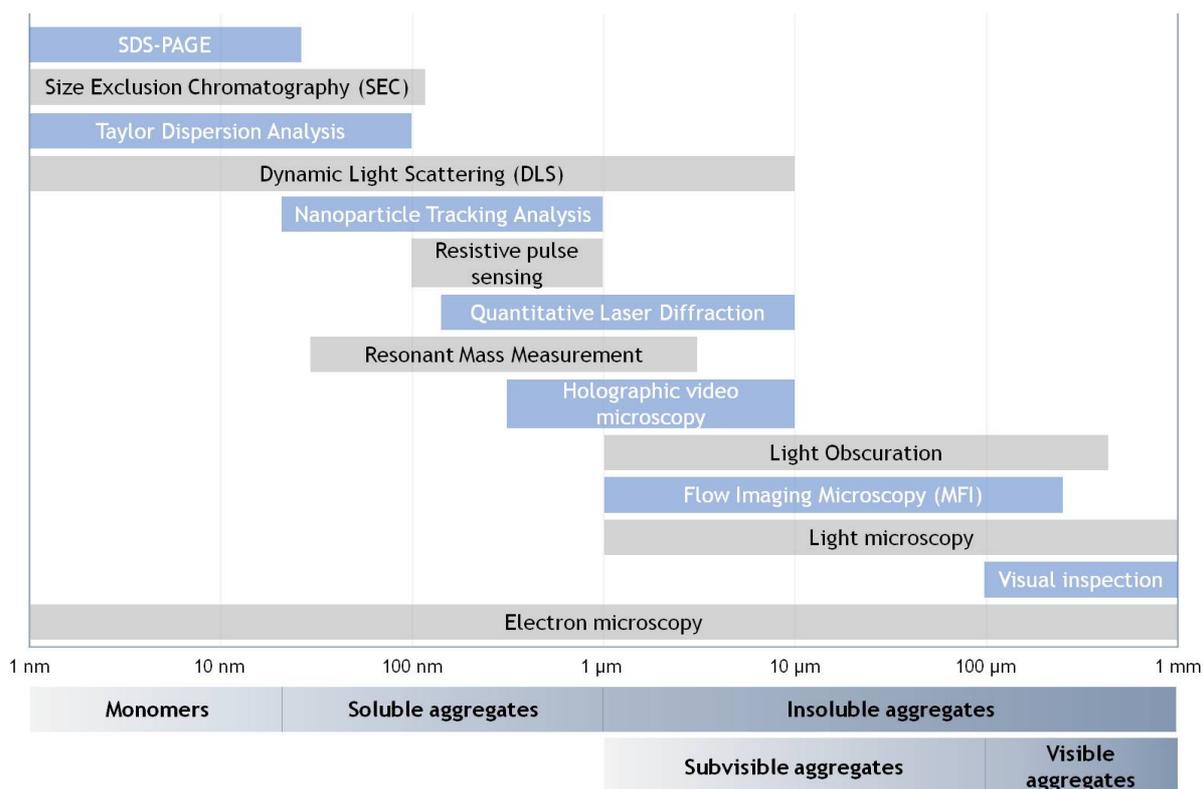


Figure 12 : Les différentes méthodes de quantification et/ou estimation de taille des agrégats.

Adapté de (Mahler et al., 2009; Wang and Roberts, 2018)

2.4. Contrôle de la formation des agrégats

2.4.1. Au cours de la production industrielle

De la culture cellulaire à la purification, les étapes de la chaîne de production d'un biomédicament incluent des procédés considérés comme facteurs de stress potentiels à la protéine. Ces facteurs précédemment décrits, tels que la température, la concentration protéique, le pH, la formulation, l'agitation, l'exposition à la lumière, la congélation/décongélation et le pompage peuvent contribuer à la formation d'agrégats de protéines.

L'inhibition complète de l'agrégation n'étant pas possible, différentes stratégies sont appliquées au cours de la production et de la purification des biomédicaments pour minimiser la formation d'agrégats (Tableau 6) et/ou éliminer les agrégats formés (Tableau 7). Parmi ces stratégies, la chromatographie est souvent utilisée pour éliminer les agrégats déjà formés et le choix de la

résine et du protocole suivi dépend du produit et du procédé de fabrication. D'autre part, plusieurs stratégies sont recommandées pour réduire la formation d'agrégats et ceci en minimisant l'effet des différents facteurs qui peuvent favoriser l'agrégation au cours de la fabrication d'un biomédicament (Vázquez-Rey and Lang, 2011).

Tableau 6 : Stratégies recommandées pour réduire la formation d'agrégats au cours de la production industrielle des anticorps.

Étape de fabrication	Facteurs favorisant l'agrégation	Solution pour minimiser l'agrégation
Inactivation virale (purification)	pH acide	Utilisation de solvants et de détergents au lieu de diminuer le pH s'avère efficace
Pompage	Forces de cisaillement durant les étapes de purification (chromatographie, ultrafiltration) et de remplissage dans les conteneurs	Réduire l'utilisation de pompes, si possible Optimiser l'étape de pompage pour réduire le risque d'agrégation
Ultrafiltration	Forces de cisaillement	Ajuster le flux et la pression en fonction de la protéine et de sa concentration
Conservation intermédiaire dans les réservoirs	Oxydation des protéines suite à l'adsorption aux surfaces solides des réservoirs (acier inoxydable, ...)	Réduire l'interface air/liquide
Conservation avant le remplissage en flacons	Congélation	Utilisation de cryo-protecteurs, congélation rapide de tous les composés de la solution
Agitation pendant les étapes de purification et d'homogénéisation	Forces de cisaillement	Éviter de vortexer et utiliser des surfactants (PS20 et PS80...)
Stockage	Agitation et variation de température	Éviter les agitations et réduire l'espace vide dans le flacon de stockage Conserver le produit à des températures inférieures à la température de fusion de l'anticorps (souvent 2 à 8°C)

Adapté de (Vázquez-Rey and Lang, 2011)

Tableau 7 : Stratégies contribuant à réduire le taux d'agrégats formés au cours de la production industrielle des anticorps.

Objectif	Type de chromatographie	Technique employée pour contrôler l'agrégation
Contribution à l'élimination des agrégats formés	Chromatographie par échange d'ions	Les agrégats se lient plus fortement aux résines échangeuses d'ions que les monomères ce qui permet la récupération de ces derniers uniquement
	Chromatographie d'exclusion stérique	Les monomères et les agrégats sont élués à des temps distincts selon leur taille
	Chromatographie par interaction hydrophobe	L'utilisation de résines plus ou moins hydrophobes permet la séparation des monomères et des agrégats, ces derniers étant plus hydrophobes
Réduction de la formation d'agrégats	Chromatographie d'affinité sur protéine A	L'utilisation de chlorure de sodium ou d'éthylène glycol permet d'augmenter le pH du tampon d'éluion
		La modification du ligand de la protéine A par ingénierie pour pouvoir utiliser des conditions d'éluion plus modérées (pH à 4,5 au lieu de 3 pour les IgG)

Adapté de (Vázquez-Rey and Lang, 2011)

Le contrôle qualité des biomédicaments s'effectue tout au long du procédé de fabrication ainsi que sur le produit fini avant la libération des lots. L'absence de particules visibles dans les solutions injectables est exigée. Les recommandations sur la quantification des particules subvisibles ont d'abord été établies par les Pharmacopées Européenne et Américaine pour s'assurer de l'absence de contaminants de taille supérieure à 10 et 25 µm pouvant bloquer les vaisseaux sanguins.

Au fil des années, ces exigences ont évolué pour s'adapter aux connaissances actuelles sur le rôle des particules subvisibles dans l'immunogénicité des biomédicaments. Les Pharmacopées Européenne (Ph. Eur. 2.9.19) et Américaine (USP <788>) sont harmonisées et précisent les critères d'acceptation, définissant le nombre maximum de particules subvisibles de taille supérieure à 10 et à 25 µm autorisées par conteneur ou par millilitre dans le cas des solutions à volume injectable supérieur à 100 mL, ainsi que les méthodes principales d'analyse exigées qui sont la technique de *light obscuration* et la microscopie (Tableau 8) (Vessely et al., 2015).

Tableau 8 : Recommandations des Pharmacopées Européenne (Ph. Eur. 2.9.19) et Américaine (USP <788>) sur la présence de particules dans les préparations de biomédicaments.

Volume injectable	Light obscuration		Microscopie	
	≥ 10 µm	≥ 25 µm	≥ 10 µm	≥ 25 µm
≤ 100 mL	6000 particules /dose	600 particules /dose	3000 particules /dose	300 particules /dose
> 100 mL	25 particules /mL	3 particules /mL	12 particules /mL	2 particules /mL

Adapté de (Mahler et al., 2009)

Les nouvelles lignes directrices de la Pharmacopée Américaine (USP <787>, USP <1787>) établies en 2014 s'intéressent aux plus petites particules de tailles variant entre 0,1 et 10 µm et recommandent l'évaluation, sans limites exigées, de la concentration en particules de taille supérieure à 2 µm et à 5 µm en plus de la quantification des particules de taille supérieure à 10 et 25 µm avec une possibilité de réduction des volumes injectables à tester jusqu'à 0,2 mL. De plus, les recommandations des agences du médicament américaine (FDA) et européenne (EMA) précisent la nécessité d'évaluer la présence d'agrégats avant la libération des lots ainsi que durant les études de stabilité et de caractériser ces agrégats grâce à plusieurs méthodes orthogonales qui permettraient de mieux évaluer leur nature, leur taille, leur quantité et leur forme (Vessely et al., 2015).

2.4.2. Après la libération des lots cliniques

Les lots libérés obéissent aux normes imposées par la Pharmacopée. Toutefois, ces mêmes lots peuvent subir différents types de stress après leur libération au cours des étapes de stockage, de transport et d'administration du produit au patient, et la seule exigence reste une inspection visuelle des préparations avant injection. De nouvelles recommandations pour une meilleure manipulation des biomédicaments ont récemment été établies à la suite du rapport des différents

problèmes qui peuvent être rencontrés avec les biomédicaments après la libération des lots cliniques (Nejadnik et al., 2018).

Au cours du stockage et du transport, les préparations de biomédicaments peuvent par exemple subir des stress d'agitation ou être exposées à la lumière ou à des températures inadéquates si elles sont mal conservées, ce qui est envisageable pour les préparations pouvant être auto-administrées à domicile (Nejadnik et al., 2018).

Les préparations peuvent également subir des stress lors de leur manipulation en vue de leur administration au patient, et ceci dans un environnement contrôlé tel que les salles hospitalières de préparation des poches de spécialités d'anticorps monoclonaux destinés à être administrés par voie IV. Plusieurs études ont montré que lors de la reconstitution des solutions de biomédicaments, l'agitation, le pompage, la contamination par des composés provenant du matériel utilisé (seringues, poches, ...) peuvent induire la formation d'agrégats (Nejadnik et al., 2018). Une autre étude a montré la présence de microparticules et de nanoparticules dans des solutions pour injections IV avant et après filtration (Pardeshi et al., 2017).

La filtration des préparations au moment de l'injection destinée à éliminer les particules pouvant se former n'est pas systématique. Elle est déjà recommandée pour presque 16 % des biomédicaments. Une étude récente a montré l'importance de la filtration au moment de l'injection en évaluant la présence d'agrégats avant et après filtration (souvent à 0,2 μm) dans plus de 19 biomédicaments stressés et non stressés tout en comparant différents types de filtres. Cette étude a montré une réduction importante de la quantité d'agrégats de taille supérieure à 1 μm après filtration avec une élimination presque complète des particules de taille supérieure à 10 et 25 μm . La filtration a également permis de réduire le nombre d'agrégats submicrométriques cependant cette réduction n'était pas aussi efficace que pour les particules plus larges (Werner and Winter, 2018).

Enfin, et de manière intéressante, une étude a montré que certains anticorps thérapeutiques (trastuzumab ou bevacizumab) étaient susceptibles de s'agréger dans certaines conditions de mélange en présence de sérum (Arvinte et al., 2013).

3. Immunogénicité des agrégats d'anticorps thérapeutiques

Malgré les contrôles avant et après libération des lots cliniques, la formation d'agrégats protéiques n'est toujours pas bien maîtrisée. La taille, la quantité, l'état irréversible des agrégats formés ainsi que la présence de néo-épitopes à leur surface sont des facteurs intrinsèques pouvant contribuer à leur immunogénicité (Moussa et al., 2016a).

Le rôle des agrégats de protéines thérapeutiques dans l'immunogénicité a fait l'objet de nombreuses études qui permettent de mieux comprendre les mécanismes de déclenchement d'une réponse immunitaire. Dans ce qui suit, nous ferons un point sur les études s'intéressant notamment aux agrégats d'anticorps thérapeutiques.

3.1. Observations cliniques

L'impact de l'agrégation des anticorps à visée thérapeutique sur leur immunogénicité est relativement peu documenté chez l'homme. Les seules études concernant les agrégats d'anticorps remontent aux années 1960, où la présence d'agrégats dans les préparations de γ -globulines (ou IgG intraveineuse, IVIG) a été corrélée à l'apparition d'anticorps spécifiques de néo-épitopes présents sur les agrégats de γ -globulines et au développement de réactions d'hypersensibilité chez certains patients (Henney and Ellis, 1968; Rosenberg, 2006). La séparation des fractions monomériques et agrégées par centrifugation a montré que le surnageant ne contenant que les monomères n'induisait pas de réaction au test cutané intradermique alors que la fraction agrégée et la solution non centrifugée induisaient des réactions d'hypersensibilité (Ellis and Henney, 1969).

D'autres études ont corrélé la présence d'agrégats dans des préparations à l'immunogénicité d'autres protéines à visée thérapeutique telles que la GH, l'EPO et les interférons (Moussa et al., 2016a).

3.2. Modèles animaux *in vivo*

Les modèles animaux couramment utilisés dans l'évaluation de l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques sont les modèles murins de type sauvage (ou WT pour *wild-type*) et transgéniques (TG). Toutefois, les résultats des études sont rarement prédictifs de la réponse immunitaire chez l'homme, notamment ceux obtenus chez les souris WT.

Les anticorps sous forme native ou agrégée sont souvent administrés aux souris par voie SC et l'immunogénicité est évaluée par la détection et le dosage des ADA formés. Une comparaison entre les voies SC et IV pour l'administration d'un anticorps monoclonal humain IgG1 marqué chez des souris WT a montré une accumulation plus importante en SC des agrégats d'anticorps (produits par agitation) comparé au monomère au niveau du site d'injection, alors que les anticorps natifs et agrégés injectés par voie IV ont rapidement disparu de la circulation et se sont accumulés au niveau du foie. De plus, la sécrétion de cytokines étaient plus importante avec les monomères et les agrégats injectés par voie SC qu'avec ceux administrés par voie IV (Filipe et al., 2013). Une deuxième étude a également montré l'accumulation des agrégats d'anticorps en SC ainsi qu'une accumulation plus importante des agrégats submicrométriques au niveau des ganglions lymphatiques et de la rate comparé aux agrégats de taille micrométrique et aux anticorps natifs (Kijanka et al., 2016).

Les différentes études *in vivo* évaluant l'immunogénicité des agrégats d'anticorps avaient pour objectif de mieux comprendre l'effet des agrégats selon leur taille, leur quantité ainsi que leur degré de modifications structurelles cependant les résultats obtenus ne sont pas similaires entre les études.

3.2.1. Modèles murins sauvages

Freitag et collaborateurs ont montré que l'administration d'agrégats d'un anticorps monoclonal murin, produits par différents types de stress, a induit une rupture de tolérance chez des souris WT avec une augmentation de la sécrétion d'ADA mais les échantillons les plus immunogènes étaient ceux qui étaient les plus concentrés en agrégats insolubles et dénaturés de taille supérieure à 1 μm (Freitag et al., 2014). Par ailleurs, plus récemment, Kijanka et collaborateurs ont montré que les fractions enrichies en agrégats submicrométriques (100 nm à 1 μm) d'un anticorps monoclonal IgG1 murin étaient immunogènes et induisaient la production d'ADA alors que les oligomères solubles (< 100 nm) et les agrégats micrométriques (> 1 μm) n'étaient pas immunogènes (Kijanka et al., 2018). Ce même groupe a également montré que les dimères d'IgG1 murin, comme l'anticorps natif, n'étaient pas immunogènes (Kijanka et al., 2019).

D'autre part, deux études ont montré que l'administration répétée d'anticorps agrégés à faibles concentrations induisaient la production d'ADA alors que des concentrations élevées induisaient une tolérance vis-à-vis de l'anticorps (Shomali et al., 2015; Uchino et al., 2017).

Les modèles de souris WT comportent un biais dans la mesure où la plupart des anticorps thérapeutiques sont étrangers pour ces souris et conduisent à la mise en place d'une réponse immunitaire même en absence d'agrégats. Ainsi, une production élevée d'ADA en réponse à l'anticorps humain sous forme native complique l'interprétation des résultats même avec une augmentation de la production d'ADA en réponse aux agrégats.

3.2.2. Modèles murins transgéniques

Afin d'éviter la mise en place d'une réponse immunitaire contre une protéine humaine, des modèles de souris TG, exprimant la protéine humaine d'intérêt, ont été développées.

La comparaison de la production d'ADA en réponse aux agrégats d'anticorps entre souris TG pour des IgG1 humaines et WT a ainsi montré des titres d'ADA supérieurs chez les souris WT (Filipe et al., 2012b).

Plusieurs études ont montré que la rupture de tolérance des souris TG par les agrégats d'anticorps dépendait notamment de l'importance des modifications chimiques qu'a subi l'anticorps. Ainsi, les agrégats présentant des néo-épitopes étaient les plus immunogènes et induisaient une production élevée d'ADA (Bessa et al., 2015; Boll et al., 2017; Filipe et al., 2012b).

Les tableaux 9 et 10 résument les différentes études *in vivo* évaluant l'immunogénicité des agrégats d'anticorps monoclonaux par la production d'ADA. L'ensemble de ces études montrent que la réponse immunitaire des souris aux agrégats dépend de nombreux facteurs, dont le modèle murin, la voie et la fréquence d'administration, l'anticorps administré ainsi que la quantité, le type d'agrégats injectés et les modifications chimiques et structurelles subies par l'anticorps lors de l'agrégation (Kraus et al., 2019; Moussa et al., 2016a).

Tableau 9 : Études *in vivo* évaluant l'immunogénicité des agrégats d'anticorps monoclonaux dans des modèles murins transgéniques.

Anticorps	Stress	Modèle murin	Résultats obtenus	Références
IgG1 humaine (IP)	Faible pH, agitation, oxydation par un métal, température élevée, congélation-décongélation	TG (IgG1 humaine) et non TG	Agrégats les plus immunogènes selon les modifications chimiques subies : oxydation par un métal > agitation, pH, température > congélation-décongélation, natif	(Filipe et al., 2012b)
IgG1 humaine (SC)	Faible pH, UV, température élevée...	TG (IgG1 humaine)	Agrégats les plus immunogènes : oligomères solubles (stress UV) avec des néo-épitopes	(Bessa et al., 2015)
IgG1 humaine (SC)	Température élevée, UV, agitation, agent oxydant	TG (IgG1 humaine)	Agrégats les plus immunogènes : particules subvisibles avec modifications chimiques	(Boll et al., 2017)

IP : administration intrapéritonéale ; SC : administration sous-cutanée ; TG : souris transgénique ; UV : ultraviolet.

Tableau 10 : Études *in vivo* évaluant l'immunogénicité des agrégats d'anticorps monoclonaux dans des modèles murins sauvages.

Anticorps	Stress	Modèle murin	Résultats obtenus	Références
IgG1 humaine marquée (SC ou IV)	Agitation	SKH1	- Accumulation des agrégats en SC - Production de cytokines (similaires entre monomères et agrégats) mais SC > IV	(Filipe et al., 2013)
IgG1 (murine et humaine) marquées (SC)	Faible pH et température élevée puis agitation	SKH1	- Accumulation des agrégats en SC plus longtemps que les anticorps natifs - Accumulation des agrégats submicrométriques (100-1000 nm) au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques	(Kijanka et al., 2016)
Anticorps monoclonal murin (SC)	Lumière, agitation, température élevée	BALB/c C57BL/6J	Agrégats les plus immunogènes : insolubles, dénaturés et de taille supérieure à 1 µm	(Freitag et al., 2014)
IgG1 murine (SC)	Faible pH et température élevée puis agitation	BALB/c	- Agrégats les plus immunogènes : submicrométriques (100-1000 nm) - Agrégats non immunogènes : oligomères solubles (< 100 nm), micrométriques (> 1 µm)	(Kijanka et al., 2018)
IgG1 murine (SC)	Faible pH, UV, température élevée	BALB/c	Dimères non immunogènes	(Kijanka et al., 2019)
Adalimumab (SC)	Agitation [seringues siliconées (SO+) ou non siliconées (SO-)]	BALB/c	Agrégats les plus immunogènes : SO+ (agrégats submicrométriques et subvisibles) à faible concentration	(Uchino et al., 2017)
Anticorps monoclonal murin (SC)	Adsorption (verre ou microparticules d'hydroxyde d'aluminium ou gouttes d'huile de silicone)	BALB/c C57BL/6J	Agrégats plus immunogènes à faible concentration Réponse ADA pareilles pour concentrations faible et élevée	(Shomali et al., 2015)
scFv humanisé (IP)	Température élevée	BALB/c	- Agrégats plus immunogènes que le fragment d'anticorps non agrégé. - ADA dirigés contre des épitopes exposés suite à l'agrégation de l'anticorps	(Eyes et al., 2019)

IP : administration intrapéritonéale ; IV : administration intraveineuse ; SC : administration sous-cutanée ; scFv : *single chain antibody variable fragment* ; UV : ultraviolet.

3.3. Études *in vitro*

La majorité des études *in vitro* qui se sont intéressées au rôle des agrégats d'anticorps dans l'immunogénicité utilisent des cellules mononuclées du sang périphérique (ou PBMC pour *peripheral blood mononuclear cells*). Ces études ont pour objectif de mimer la réponse immunitaire chez l'homme mise en place suite à l'administration du biomédicament pouvant contenir des agrégats afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires responsables de l'immunogénicité (Moussa et al., 2016a).

Une première étude de Joubert et collaborateurs en 2012 a proposé une signature cytokinique témoignant de l'activation de PBMC humaines en réponse à différents types d'agrégats d'anticorps monoclonaux induits par des stress divers. Cette signature cytokinique comprenait

l'IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL2, CCL3, CCL4, MMP2 et TNF α . Les agrégats induisant les réponses les plus importantes étaient ceux générés par agitation ainsi que ceux de taille variant entre 2 et 10 μm (Joubert et al., 2012). Des résultats similaires ont été obtenus par Telikepalli et collaborateurs qui ont soumis un anticorps monoclonal à un stress d'agitation et ont séparé les agrégats selon leur taille pour évaluer l'effet de chaque fraction sur la sécrétion de cytokines par les PBMC. Cette étude a montré que la fraction d'agrégats de tailles entre 5 et 10 μm induisait une sécrétion de cytokines plus importante que les fractions d'agrégats de taille de 1 à 2 μm , 2 à 5 μm et supérieure à 10 μm (Telikepalli et al., 2015). L'activation des PBMC a également été observée avec des agrégats d'IVIG non seulement par la sécrétion de cytokines et chimiokines (IL1 β , IL6, TNF α , IL10, CCL2, CCL7, CCL3, CCL20) mais également par l'activation des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) : p38 MAPK, *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) et *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) (Polumuri et al., 2018). D'autre part, Moussa et collaborateurs ont montré que les agrégats d'IVIG formés sous stress mécanique (agitation) induisaient une sécrétion de cytokines plus importante par les PBMC, les monocytes et la lignée cellulaire des THP-1 que les agrégats formés sous d'autres stress (stress thermique ou oxydation par métal). En effet, cette étude proposait l'utilisation de la lignée de cellules THP-1, pouvant mimer la réponse des monocytes, pour prédire et évaluer l'immunogénicité des agrégats d'anticorps (Moussa et al., 2016b).

Parmi ces études, certaines se sont aussi intéressées aux récepteurs pouvant être impliqués dans l'interaction des agrégats avec les PBMC mais les résultats obtenus ne sont pas identiques d'une étude à l'autre. Joubert et collaborateurs ont montré que les récepteurs de type Toll (ou TLR pour *Toll-like receptors*) 2 et 4, les récepteurs au fragment Fc, Fc γ RI et Fc γ RIII, ainsi que le système du complément étaient impliqués dans la réponse des PBMC aux agrégats (Joubert et al., 2012). D'autre part, Moussa et collaborateurs ont montré que la sécrétion cytokinique en réponse aux agrégats d'IVIG dépendait notamment des TLR2 et TLR4 et non pas des Fc γ R

(Moussa et al., 2016b) alors que Polumuri et collaborateurs ont montré que l'activation des PBMC était favorisée par l'interaction des agrégats avec les FcγR et non pas les TLR (Polumuri et al., 2018).

D'autres études se sont plus particulièrement focalisées sur l'effet des agrégats d'anticorps sur la maturation des DC en utilisant un modèle de DC dérivées de monocytes (moDC) isolées des PBMC de donneurs sains. Rombach-Riegraf et collaborateurs ont montré que les agrégats d'anticorps formés sous stress thermique induisaient une augmentation de l'expression des marqueurs de costimulation CD80 et CD86 et d'activation CD83 à la surface des moDC essentiels pour l'activation de LT. D'autre part, la technique du MAPPs a été utilisée pour déterminer les séquences peptidiques chargées sur les molécules du CMH de classe II des moDC. Cette technique a permis de montrer que les moDC incubées en présence des agrégats d'anticorps présentaient plus de peptides, en nombre et diversité, que les moDC incubées en présence de l'anticorps natif et présentant un nombre limité de peptides. Les peptides dérivant des anticorps agrégés étaient issus des régions des chaînes lourdes et légères des anticorps alors que ceux dérivant de l'anticorps natif provenaient notamment de la même région de la chaîne lourde (Rombach-Riegraf et al., 2014).

Les agrégats d'anticorps utilisés dans les différentes études *in vitro* et *in vivo* pour l'évaluation de l'immunogénicité sont pour la plupart produits par application de stress exagérés induisant la formation d'agrégats de taille et quantité importantes. Afin de s'approcher des quantités d'agrégats pouvant être retrouvées dans les biomédicaments, Ahmadi et collaborateurs ont étudié l'effet immunomodulateur d'anticorps (trastuzumab et rituximab) faiblement agrégés constituant moins de 3 % de la quantité totale de protéines et dans le spectre de taille des particules subvisibles. Les agrégats de trastuzumab, anticorps faiblement immunogène en clinique, induisaient une faible activation des moDC (augmentation de la sécrétion d'IL-10 et marqueurs de surface CD86, HLA-DR par rapport à l'anticorps natif) ainsi que la prolifération

des LT CD4⁺ et la production de cytokines (IL-2 et IL-10). Toutefois, le rituximab agrégé n'induisait pas d'augmentation de l'activation des moDC et de la réponse des LT par rapport à l'anticorps natif ayant une immunogénicité intrinsèque élevée. Ainsi, l'effet des agrégats sur la réponse immune peut être accentué dans le cas des anticorps à faible potentiel immunogène. D'autre part, l'étude par microscopie confocale de l'internalisation des agrégats de rituximab, marqués à l'alexa fluor 488, a révélé leur accumulation dans les endosomes tardifs des moDC après 30 minutes d'incubation (Ahmadi et al., 2015).

L'évaluation de la réponse T a été proposée comme outil de « prédiction » de l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques. Pour cela, Joubert et collaborateurs ont étudié l'effet de 10 anticorps monoclonaux, natifs et agrégés, sur la prolifération des LT ainsi que la sécrétion des cytokines IL-2 et IFN- γ dans des cultures de PBMC de 50 donneurs sains. Les résultats obtenus ont montré que la réponse T pour les anticorps natifs corrélait avec leur immunogénicité clinique alors que l'agrégation de ces anticorps induisait une augmentation de la réponse T par rapport à l'anticorps natif (Joubert et al., 2016).

Les différentes études *in vitro* présentées ci-dessus montrent que dans le cas des agrégats d'anticorps thérapeutiques, différents modèles d'études peuvent être proposés pour prédire et évaluer la réponse immunitaire au niveau cellulaire et moléculaire.

3.4. Prédiction *in silico*

Il existe diverses méthodes de prédiction de l'immunogénicité des protéines thérapeutiques natives. La prédiction du potentiel immunogène des agrégats reste plus complexe à cause de l'hétérogénéité des agrégats pouvant se former sous différents types de stress ainsi que la complexité de la caractérisation tridimensionnelle des agrégats (Moussa et al., 2016a). Toutefois, des méthodes ont été développées pour prédire les tendances d'agrégation des protéines thérapeutiques notamment en déterminant les APR (Meric et al., 2017).

Une seule étude se basant sur la modélisation computationnelle a montré que les interactions entre les agrégats et les récepteurs des LB sont peu probables. Cette même étude a également montré que les agrégats peuvent participer à la mise en place d'une réponse T-dépendante grâce à leur rôle de signal de danger pouvant induire une rupture de tolérance ainsi qu'aux néo-épitopes qu'ils présentent (Yin et al., 2015).

Chapitre III : Les étapes clés déclenchant une réponse immunitaire adaptative contre les anticorps thérapeutiques et agrégats

L'immunisation des patients contre une protéine à visée thérapeutique se traduit par la formation d'ADA de haute affinité dirigée contre la protéine, ce qui implique la mise en place d'une réponse immunitaire classique mettant en jeu des cellules présentatrices d'antigène, notamment les DC, et des LT CD4⁺ qui vont participer à la maturation complète des LB. D'une manière générale, le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative efficace dirigée contre une protéine thérapeutique nécessite la présentation de l'antigène aux LT, mais de plus, la présence d'un signal de danger.

Ce chapitre est consacré aux interactions des anticorps thérapeutiques avec le système immunitaire, et se focalisera sur le rôle des agrégats d'anticorps dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative.

1. Cellules dendritiques : intermédiaires entre les anticorps thérapeutiques et le système immunitaire adaptatif

Les DC sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles définies par leur capacité à capturer les antigènes dans les tissus périphériques où elles résident, de les transporter vers les organes lymphoïdes secondaires et de les présenter aux LT naïfs spécifiques.

1.1. Capture et présentation de l'antigène

Il existe différents sous-types de DC qui peuvent être classifiées selon leur localisation, leur phénotype et leurs fonctions (Figure 13). Les DC peuvent être divisées en DC plasmacytoïdes (pDC), principalement localisées dans les organes lymphoïdes ; DC conventionnelles (cDC1 et cDC2), résidentes dans les organes lymphoïdes ou localisées dans les tissus ou le sang où elles entrent en contact avec des antigènes ; DC inflammatoires, différenciées à partir de monocytes

sanguins lors d'une inflammation ou d'une infection ; et cellules de Langerhans (LC), résidentes de l'épiderme (Collin and Bigley, 2018; Eisenbarth, 2019).

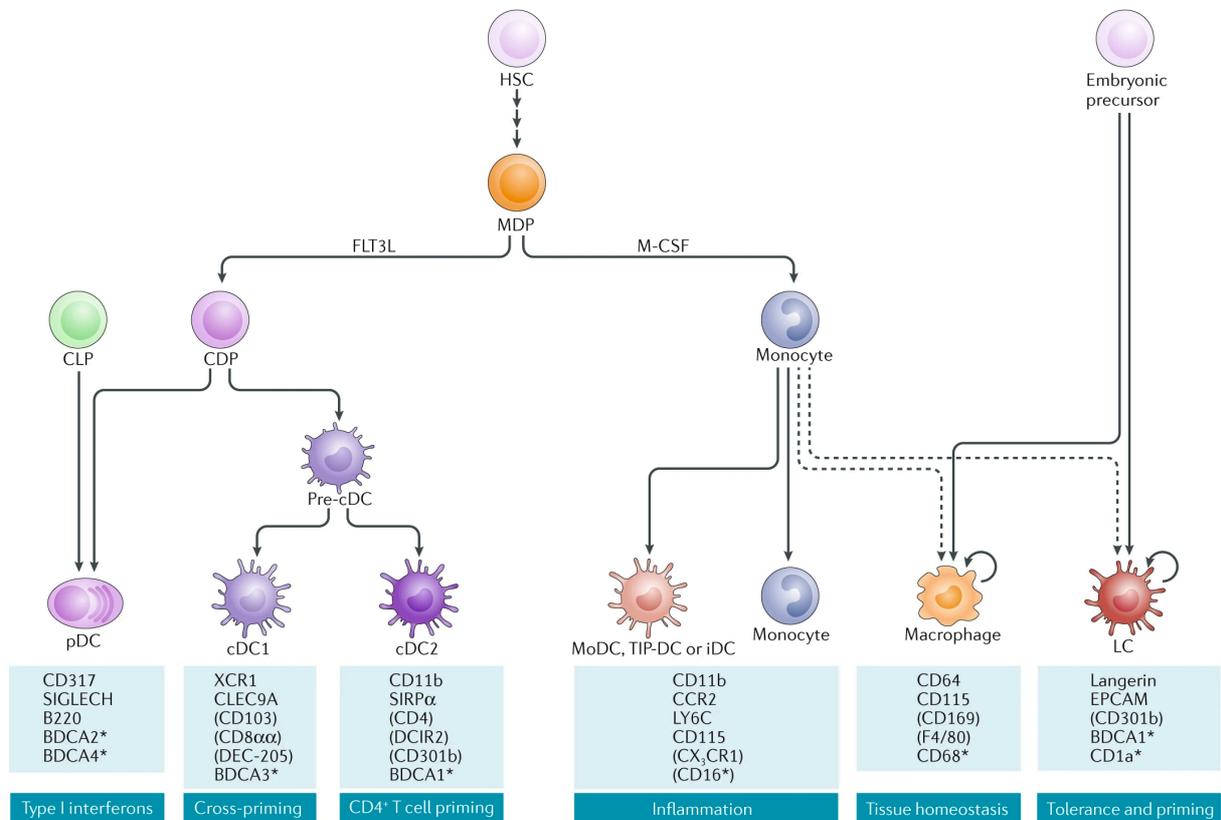


Figure 13 : Sous-populations de cellules dendritiques et cellules apparentées.

De (Eisenbarth, 2019)

Des marqueurs spécifiques et le rôle principal de chaque sous-population sont indiqués. L'expression des marqueurs indiqués entre parenthèse varie en fonction des tissus.

* : marqueur exprimé uniquement sur les cellules humaines ; cDC : cellules dendritiques conventionnelles ; CDP : progéniteur commun aux cellules dendritiques ; CLP : progéniteur lymphoïde commun ; iDC : cellules dendritiques inflammatoires ; HSC : cellule souche hématopoïétique ; LC : cellules de Langerhans ; MDP : progéniteur commun aux macrophages et aux cellules dendritiques ; MoDC : cellules dendritiques dérivées de monocytes ; pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes ; TIP-DC : cellules dendritiques produisant du TNF α et des oxydes nitriques

1.1.1. Internalisation de l'antigène par les cellules dendritiques

L'état immature des DC recrutées dans les tissus périphériques leur confère une forte capacité de reconnaissance et de capture des antigènes. Les DC peuvent internaliser les antigènes via différents mécanismes présentés dans la figure 14 : l'endocytose médiée par les récepteurs, la macropinocytose et la phagocytose.

L'endocytose médiée par les récepteurs permet de capturer les antigènes solubles dans de petites vésicules de 0,1 μm de diamètre, recouvertes de clathrine. Ce processus implique des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des DC tels que les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines (FcR) et les récepteurs aux lectines de types C (CLR) (Liu and Roche, 2015; Roche and Furuta, 2015).

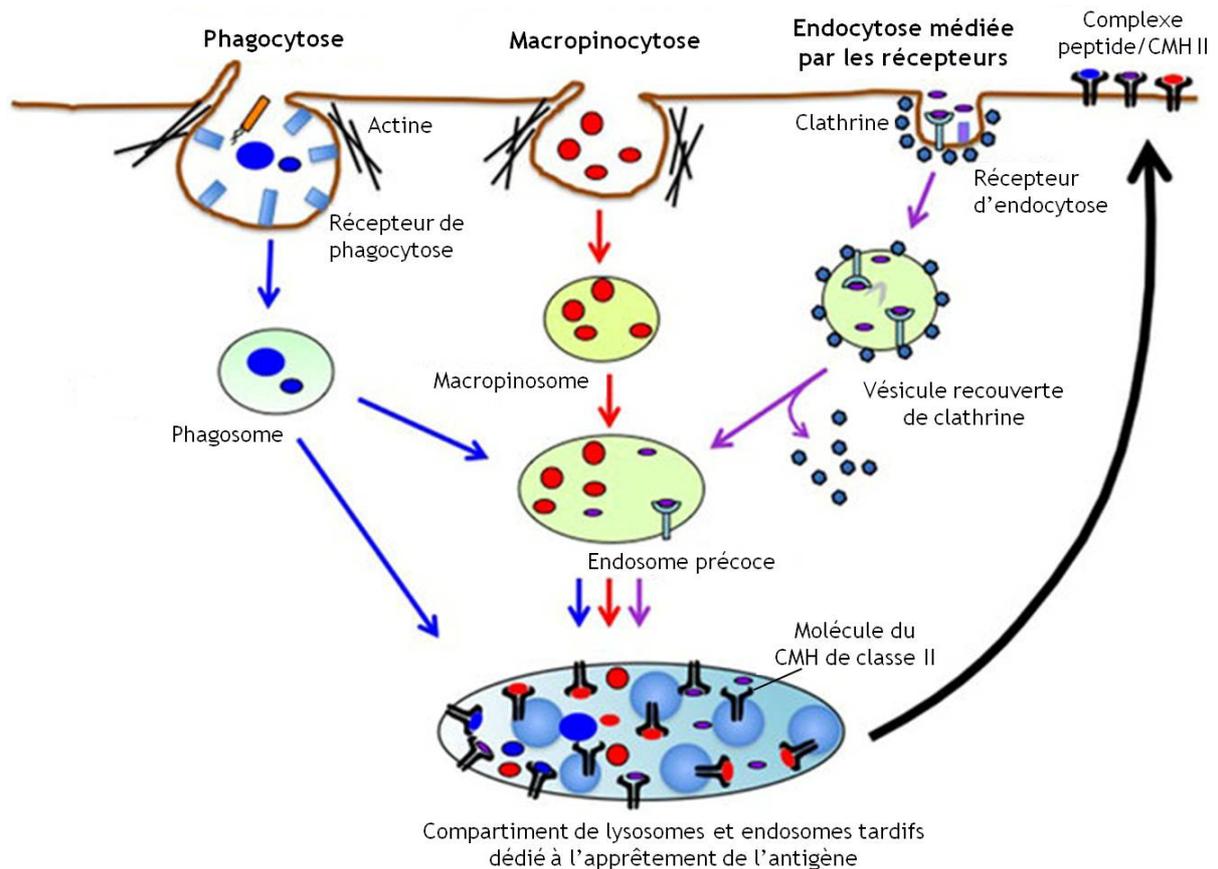


Figure 14 : Voies d'internalisation des antigènes dans les cellules dendritiques.

Adapté de (Liu and Roche, 2015)

La macropinocytose, source majeure d'internalisation des antigènes par les DC immatures, se caractérise par la formation de protrusions membranaires permettant d'internaliser des antigènes solubles d'une manière non spécifique dans des macropinosomes de diamètre variant entre 0,2 et 5 μm . C'est un processus dépendant de l'actine et impliquant différentes molécules intracellulaires dont notamment les Rho GTPases (Cdc42 et Rac) qui interviennent dans le remodelage du cytosquelette d'actine (Liu and Roche, 2015). Les antigènes exogènes

internalisés par les macropinosomes ou les vésicules de clathrine sont pris en charge par les endosomes précoces qui forment ensuite des endosomes tardifs qui fusionnent avec les lysosomes. Dans ces compartiments riches en molécules du CMH de classe II, les antigènes sont apprêtés par dégradation protéolytique et les peptides formés sont chargés sur les molécules du CMH de classe II pour ensuite être présentés aux LT CD4⁺ (Roche and Furuta, 2015).

L'internalisation par phagocytose est de manière générale médiée par des récepteurs comme les FcR, les CLR et les récepteurs scavenger. Elle permet de capturer des particules de taille supérieure à 0,5 µm. La polymérisation de filaments d'actine permet la réorganisation de la membrane autour des particules à internaliser. Les phagosomes formés fusionnent avec les lysosomes ou les compartiments formés de lysosomes et d'endosomes tardifs, riches en molécules du CMH de classe II, ce qui permet l'apprêtement des antigènes et la formation des complexes CMH/peptide (Freeman and Grinstein, 2014; Roche and Furuta, 2015).

Une étude s'intéressant particulièrement aux mécanismes d'internalisation d'agrégats peptidiques a montré que les agrégats de diamètre inférieur à 500 nm sont capturés par des cellules HEK-293 par endocytose de phase fluide, alors que l'internalisation d'agrégats de diamètre supérieur à 1 µm implique le remodelage du cytosquelette et la polymérisation de l'actine suggérant une capture par phagocytose ou macropinocytose (Couceiro et al., 2015).

1.1.2. Apprêtement de l'antigène et présentation par les molécules du CMH

Comme précisé ci-dessous, les antigènes capturés sont chargés sur les molécules du CMH afin d'être présentés aux LT. Il existe deux classes de gènes dits classiques (classes I et II) codant pour les molécules du CMH humain (ou HLA pour *Human Leukocyte Antigen*) qui assurent la présentation de l'antigène et qui se distinguent par leur structure, leur mode de liaison aux peptides et leur distribution histologique.

Les molécules du CMH de classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) exprimé par toutes les cellules nucléées présentent les peptides antigéniques endogènes (cytoplasmiques et nucléaires) aux LT CD8⁺. Les antigènes endogènes sont dégradés via la voie du protéasome en peptides qui seront ensuite transloqués dans le réticulum endoplasmique où ils se lient aux molécules du CMH de classe I formées d'une chaîne lourde α et d'une chaîne légère, la β 2-microglobuline (Blum et al., 2013).

Par ailleurs, les molécules du CMH de classe II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) sont exprimées de manière constitutive sur les CPA professionnelles (DC, LB, monocytes et macrophages) et présentent les peptides dérivant d'antigènes exogènes aux LT CD4⁺. Ces molécules, synthétisées dans le réticulum endoplasmique, sont formées de deux chaînes α et β , chacune constituée de deux domaines extracellulaires (α 1 et α 2 ; β 1 et β 2) et sont associées à la chaîne invariante « Ii » qui aide la molécule à se replier correctement. Le sillon de présentation des peptides antigéniques, formés de 12 à 20 acides aminés, est délimité par les domaines α 1 et β 1 et bloqué par CLIP (pour class II associated invariant chain peptides). La dégradation des antigènes internalisés par les protéases est réalisée dans les compartiments endosomaux et lysosomaux. Ces derniers comportent près de 75 % des molécules du CMH de classe II dans les DC immatures. À ce niveau, la chaîne invariante est dégradée puis le fragment CLIP est échangé avec le peptide à présenter. Une fois le peptide chargé sur la molécule du CMH, le complexe CMH/peptide est transféré vers la membrane plasmique pour être présenté aux LT CD4⁺ (Blum et al., 2013; Holland et al., 2013; Roche and Furuta, 2015).

Dans le cas des agrégats d'anticorps, une étude d'Ahmadi et collaborateurs a montré que des agrégats de rituximab marqués sont pris en charge par les moDC et co-localisent avec les molécules HLA-DR dès 30 min d'incubation dans des compartiments intracellulaires, présentés comme étant des endosomes tardifs, contrairement au rituximab non agrégé qui semble être peu internalisé (Ahmadi et al., 2015).

Une autre étude de Rombach-Reigraf et collaborateurs, évaluant la présentation de peptides dérivant d'anticorps monoclonaux et de leurs agrégats, a montré grâce à la technique du MAPPs, une augmentation du nombre et de la diversité des peptides présentés par les HLA-DR de moDC traitées par les agrégats d'anticorps par rapport aux cellules traitées par les anticorps natifs. Cette technique a été utilisée pour tester des agrégats préparés sous différents stress (agitation couplée ou non à une température élevée, congélation-décongélation) sur des moDC de plusieurs donneurs sains. Les résultats ont montré que le nombre de peptides ayant des séquences d'acides aminés spécifique était augmenté entre 1,1 et 16,6 fois par rapport à celui obtenu avec l'anticorps natif (Rombach-Riegraf et al., 2014).

1.2. Maturation et migration des cellules dendritiques

1.2.1. Reconnaissance des signaux de danger par les cellules dendritiques

Les DC capturent et présentent les antigènes exogènes et endogènes de manière continue. Cependant, les DC ne seront activées de manière optimale pour initier une réponse immunitaire que si elles sont en présence de molécules définissant un danger pour l'organisme. En effet, la notion de « signal de danger » a été introduite en 1994 par l'immunologiste Polly Matzinger qui explique que la présence d'un tel signal, qu'il soit du soi ou du non soi, conduira au déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative alors que l'absence de signal induirait la tolérance (Matzinger, 1994).

L'activation des DC peut être induite par des signaux de danger exogènes, les MAMP (*Microbial-Associated Molecular Patterns*) qui correspondent à des motifs conservés exprimés par les pathogènes, ou par des signaux de danger endogènes, les DAMP (*Damage-Associated Molecular Patterns*), libérés par des cellules ou tissus endommagés ou subissant un stress (Matzinger, 2002; Seong and Matzinger, 2004). Un troisième type de signal de danger a plus récemment été introduit et il correspond aux NAMP (*Nanoparticle-Associated Molecular*

Patterns) qui sont des motifs pouvant être présentés à la surface de nanoparticules (Farrera and Fadeel, 2015).

Ces signaux de danger sont reconnus par les DC grâce aux *Pattern Recognition Receptors* (PRR), récepteurs intracellulaires ou extracellulaires appartenant aux familles des TLR, NLR (*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*), CLR et RLR (*Retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1)-like receptors*) (Takeuchi and Akira, 2010).

Parmi ces récepteurs, le TLR2 et le TLR4 ont été montré comme impliqués dans la réponse des PBMC aux agrégats d'anticorps monoclonaux. En effet, le prétraitement des PBMC avec des anticorps bloquant des TLR2 et TLR4 a induit une diminution de la production de cytokines et chimiokines en réponse aux agrégats d'anticorps (Joubert et al., 2012).

1.2.2. Maturation et migration des cellules dendritiques

L'internalisation des antigènes et la reconnaissance de signaux de danger favorisent la maturation des DC en induisant des changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels de ces cellules. Ces modifications sont favorisées suite à l'activation de voies de signalisation induites par l'engagement de certains récepteurs par les antigènes ainsi que par la capture de ces derniers.

En effet, les modifications morphologiques des DC lors de la maturation se caractérisent par le remodelage du cytosquelette. Ainsi, les DC perdent leur forme initiale pour acquérir une structure en forme d'étoile avec des prolongements cytoplasmiques appelés dendrites (Verdijk et al., 2004).

Comme précisé précédemment, différents types de récepteurs peuvent être impliqués dans l'internalisation des antigènes par les DC immatures et sont responsables de l'activation de certaines voies de signalisation, telles que la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et les Rho GTPases Rac1 et Cdc42. Cependant, la maturation des DC induit une réduction de la capacité

d'internalisation, avec notamment une diminution de l'expression des récepteurs impliqués dans la phagocytose et l'endocytose. Cette perte de la fonction de capture des antigènes est accompagnée de l'acquisition de la fonction de présentation d'antigène avec une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II (Sato and Fujita, 2007).

Par ailleurs, l'engagement de récepteurs, tels que les PRR responsables de la reconnaissance des signaux de danger ou les FcR impliqués dans l'internalisation des antigènes, induit en aval l'activation de voies de signalisation qui participent à l'induction de la production de cytokines et chimiokines par les DC et de l'expression de marqueurs de surface. Ainsi les DC matures vont exprimer les marqueurs de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 et le marqueur d'activation CD83 indispensables à l'activation des LT. De plus, elles vont diminuer voire perdre l'expression des récepteurs CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 et CXCR1, responsables de leur recrutement vers les tissus périphériques grâce aux chimiokines CCL3, CCL5, CCL20 et IL-8. En parallèle, les DC matures augmentent l'expression d'autres récepteurs tels que CCR7 et CXCR4 qui vont favoriser la migration des DC vers les ganglions lymphatiques. Les chimiokines CCL19 et CCL21 vont attirer les DC exprimant notamment le CCR7, ces chimiokines étant sécrétées dans les zones riches en LT des organes lymphoïdes secondaires et le CCL21 également sécrété par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques (Gunn et al., 1998). Les DC vont également augmenter leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et IL-12 et de chimiokines tels que CCL2 et CCL3 (Nagorsen et al., 2004; Sato and Fujita, 2007).

Ainsi, les DC vont acquérir au cours de la maturation des capacités de présentation d'antigène, de sécrétion de cytokines et de chimiokines, d'expression de marqueurs de co-stimulation et de migration qui vont leur permettre d'activer les LT CD4⁺ naïfs spécifiques au niveau des organes lymphoïdes secondaires (Figure 15).

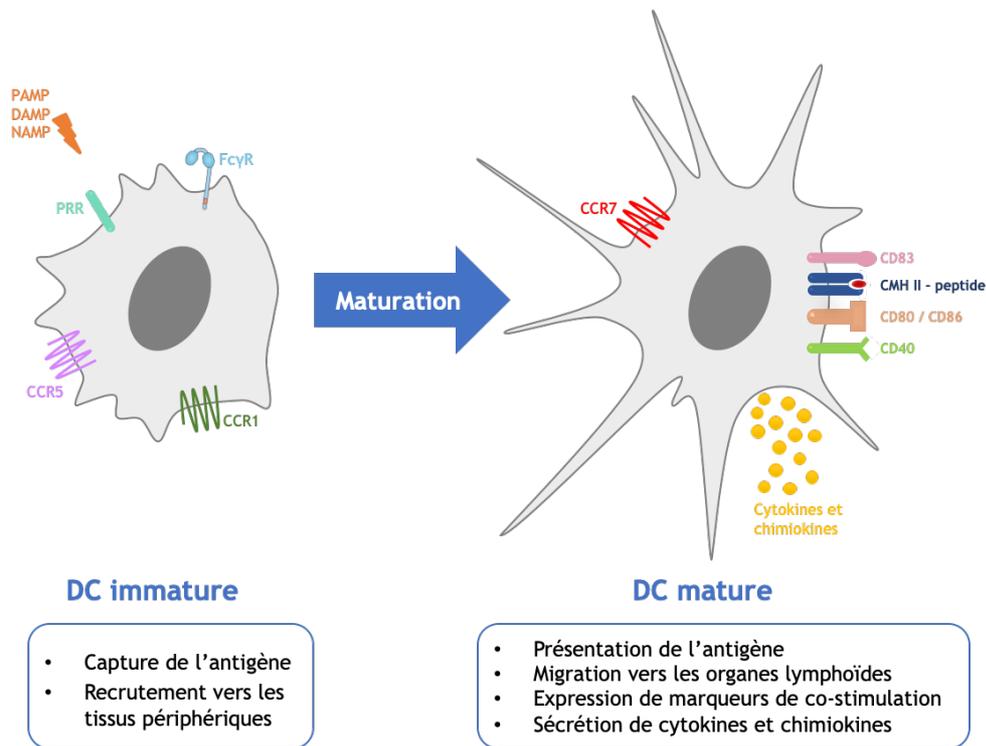


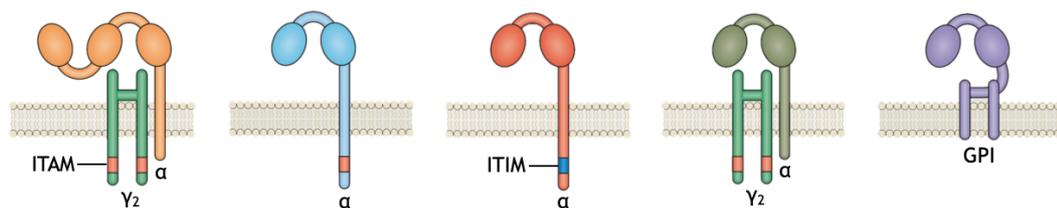
Figure 15 : Phénotype des cellules dendritiques immatures ou matures.

Comme précisé dans le chapitre 2, quelques études se sont intéressées aux modifications phénotypiques des moDC en réponse aux agrégats d'anticorps thérapeutiques en suggérant que les agrégats joueraient le rôle de signaux de danger. Ces études ont montré que les anticorps à l'état natif induisaient peu ou pas de maturation des moDC alors que les agrégats d'anticorps pouvaient induire une augmentation de l'expression des marqueurs de surface (notamment CD83 et CD86) et de la sécrétion de cytokines et chimiokines (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, CCL2, CCL3, CCL4), le degré de maturation des moDC variant en fonction de l'anticorps thérapeutique en question ainsi que de la quantité et de la taille des agrégats testés (Ahmadi et al., 2015; Gallais et al., 2017; Rombach-Riegraf et al., 2014).

1.3. Implication des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines G dans la réponse des cellules dendritiques

Les récepteurs Fc γ R sont des glycoprotéines membranaires de la superfamille des immunoglobulines qui peuvent se lier aux IgG via leur fragment Fc. Les récepteurs Fc γ R humains comprennent des récepteurs activateurs, le Fc γ RI (CD64), le Fc γ RIIa (CD32a), le Fc γ RIIc (CD32c), le Fc γ RIIIa (CD16a) et le Fc γ RIIIb (CD16b) et un récepteur inhibiteur, le Fc γ RIIb (CD32b). Le FcRn (neonatal Fc receptor) fait également partie de la famille des Fc γ R et il est responsable du recyclage des IgG (Guilliams et al., 2014). Les différentes isoformes des Fc γ R diffèrent entre elles selon leur structure, leur affinité aux ligands ainsi que leur expression à la surface de différents types cellulaires (Tableau 11).

Tableau 11 : Caractéristiques des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines G humains.



Récepteur	Fc γ RI	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIIa	Fc γ RIIIb
Affinité	IgG1 = IgG4 > IgG3	IgG1 > IgG3 > IgG4 - IgG2	IgG3 - IgG4 > IgG1 > IgG2	IgG3 > IgG1 - IgG4 > IgG2	IgG3 > IgG1 - IgG4
Expression sur les cDC	+/- (inductible)	++	++	+/- (inductible)	-
Expression sur les moDC	-	++	++	+/-	?

Adapté de (Boumazos et al., 2016; Guilliams et al., 2014; Piemonti et al., 2000)

α : chaîne α de liaison du ligand ; cDC : cellules dendritiques conventionnelles, γ_2 : chaîne FcR- γ de signalisation intracellulaire ; GPI : *Glycosyl Phosphatidyl-Inositol* ; ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* ; ITIM : *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* ; moDC : cellules dendritiques dérivées de monocytes.

Les récepteurs Fc γ RI présentent une haute affinité pour les IgG monomériques (notamment IgG1 et IgG3), alors que les récepteurs Fc γ RII et Fc γ RIII ont une faible affinité et ne peuvent fixer que des complexes immuns formés d'antigènes et d'IgG ou des agrégats d'immunoglobulines (Daëron, 1997; Guilliams et al., 2014).

Comme présenté dans le tableau 9, les DC n'expriment pas tous les récepteurs FcγR de manière équivalente. Plusieurs études ont montré que les récepteurs FcγRIIa et FcγRIIb sont les plus exprimés par les cDC et moDC différenciées *in vitro*, alors que l'expression des récepteurs FcγRI et FcγRIIIa est faible, voire nulle (Boruchov et al., 2005; Bournazos et al., 2016; Piemonti et al., 2000).

L'engagement des récepteurs FcγR activateurs par un complexe immun permet d'induire l'activation de voies de signalisation en aval de ces récepteurs. La dimérisation ou l'oligomérisation des récepteurs FcγR (avec des FcγR ou d'autres types de récepteurs) est nécessaire afin d'éviter l'activation constitutive du récepteur par les immunoglobulines monomériques circulantes. L'engagement de FcγR activateurs va tout d'abord conduire à la phosphorylation des résidus tyrosine au niveau de l'ITAM (pour *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) ce qui permet le recrutement de tyrosine-kinases de la famille Src, dont notamment la protéine Syk (pour *spleen tyrosine kinase*) dans les DC, grâce à leur deux domaines SH2 (pour *src homology 2*). La tyrosine kinase Syk joue un rôle dans la phagocytose et la maturation des DC à travers l'activation de cascades de signalisation comme par exemple PI3K/Akt, Ras/ERK, PLCγ/NFAT, Vav-1/Rac et IKK/NF-κB. Les facteurs de transcription activés, tels que NF-κB, c-jun et c-fos, vont ensuite transloquer dans le noyau pour induire la transcription de nombreux gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et des marqueurs de co-stimulation jouant ainsi un rôle dans la maturation des DC. Par ailleurs, l'activation de la voie de signalisation Syk peut également activer la GTPase Rac qui est non seulement impliquée dans l'activation de protéines telles que JNK et NF-κB mais aussi dans la polymérisation de l'actine favorisant ainsi la phagocytose et l'internalisation des antigènes. Il a également été montré que l'activation de Syk via les récepteurs activateurs FcγR dans les moDC favorisait le processus d'apprêtement de l'antigène et de sa présentation sur les molécules du CMH de classe II (Figure 16) (Guilliams et al., 2014; Rosales and Uribe-Querol, 2017).

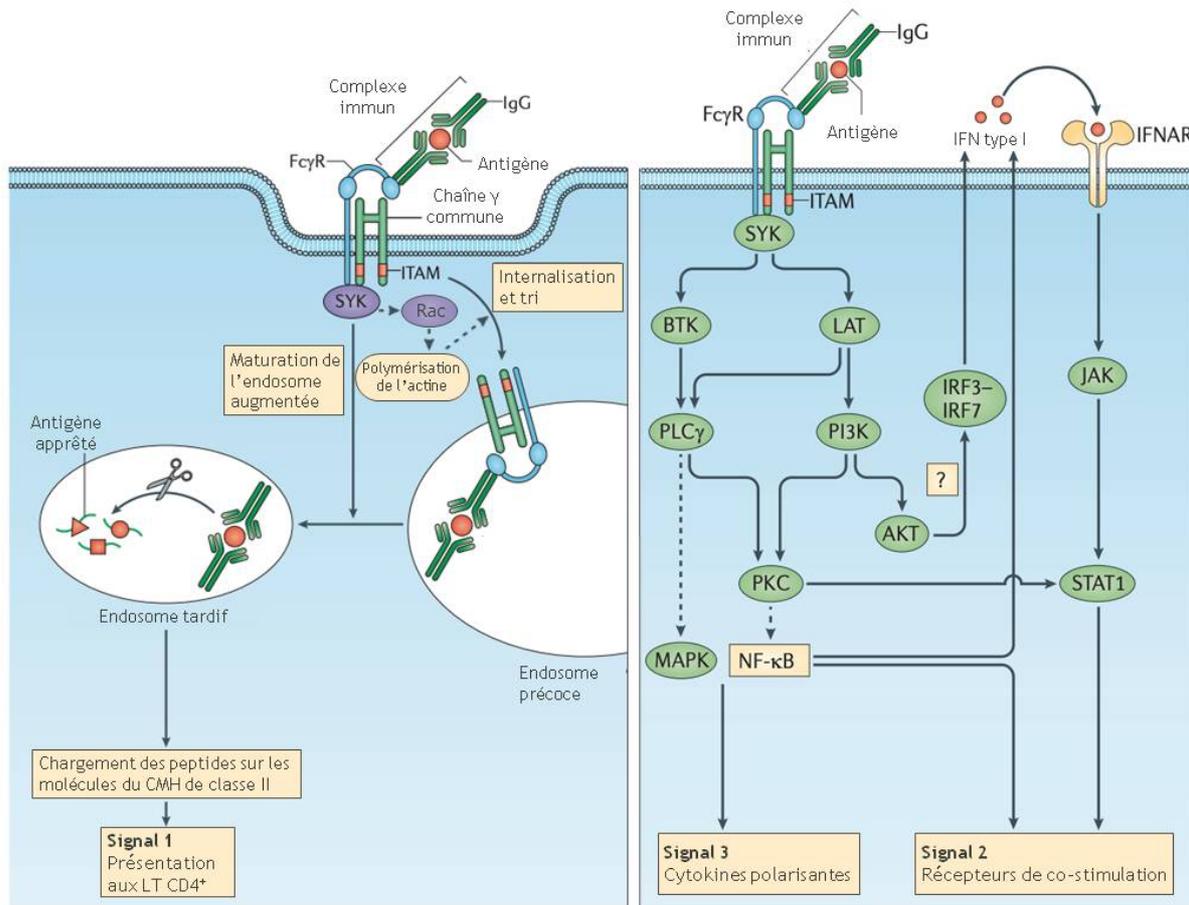


Figure 16 : Implication des récepteurs activateurs FcγR dans la réponse des cellules dendritiques à un complexe immunitaire.

Adapté de (Guilliams et al., 2014; Rosales and Uribe-Querol, 2017)

IFN: interféron ; IFNAR : type I IFN receptor ; IRF : interféron-regulatory factor ; JAK : Janus kinase ; LAT : linker for activation of T cell ; MAPK : mitogen-activated protein kinase ; NF-κB : nuclear factor-κB ; PI3K : phosphoinositide 3-kinase ; PKC : protein kinase C ; PLCγ : phospholipase Cγ ; STAT1 : signal transducer and activator of transcription 1.

Enfin, le rôle majeur du récepteur inhibiteur FcγRIIb est de réguler les signaux activateurs en se dimérisant avec un récepteur activateur. Ceci conduit à la phosphorylation des résidus tyrosine de l'ITIM (pour *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) du récepteur permettant le recrutement des phosphatases SHIP (pour *SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase*), contre-balançant ainsi les effets médiés par les récepteurs activateurs. Il existe donc dans les DC un équilibre entre l'effet activateur du FcγRIIa et l'effet inhibiteur du FcγRIIb ce qui peut amener un biais dans les études visant à déterminer le rôle de ces récepteurs dans l'interaction de la cellule avec les anticorps ou des agrégats d'anticorps (Guilliams et al., 2014).

2. Réponse des lymphocytes T

Les anticorps thérapeutiques et leurs agrégats sont considérés comme des antigènes exogènes et seraient donc présentés sous forme de peptides via les molécules du CMH de classe II aux LT CD4⁺. Dans cette perspective, nous nous focaliserons dans cette partie sur la réponse des LT CD4⁺.

2.1. Activation et prolifération des lymphocytes T

L'activation des LT et leur orientation en LT effecteurs requiert la présentation de l'antigène par des DC matures. Ainsi, après la capture et l'apprêtement des antigènes, les DC matures migrent vers les organes lymphoïdes secondaires d'une manière CCR7-dépendente afin de présenter l'antigène aux LT CD4⁺ dont l'activation nécessite trois signaux (Figure 17).

Les DC vont tout d'abord interagir avec les LT via le complexe CMH/peptide et le TCR, ce qui constitue le premier signal d'activation. Chaque combinaison TCR – CMH/peptide est unique et permet d'assurer la spécificité de la réponse induite (Chen and Flies, 2013).

Un second signal de costimulation doit ensuite être induit. L'engagement du TCR sera donc suivi de modifications du cytosquelette des LT ainsi que de la réorganisation de la distribution des protéines de surface et des protéines de signalisation et de transport intracellulaires, facilitant la formation d'une synapse entre la DC et le LT. À ce niveau, les molécules de costimulation et d'adhésion ainsi que les molécules du CMH et les TCR se concentrent et renforcent la communication entre les deux cellules. L'absence de ces interactions et donc du second signal d'activation induit une anergie ou une apoptose du LT (Fooksman et al., 2010).

En plus des molécules de costimulation et d'adhésion, les DC et les LT expriment à leur surface des molécules de co-inhibition qui permettent de contrôler l'activation des LT en induisant un signal inhibiteur intracellulaire. Par exemple, les molécules de costimulation CD80 et CD86, dont l'expression est augmentée dans les DC matures, interagissent avec la molécule CD28

exprimée de manière constitutive sur les LT favorisant ainsi leur activation. Cependant, ces molécules peuvent également se lier à la molécule CTLA-4 (pour cytotoxic T lymphocyte antigen-4) qui induit l'anergie des LT activés afin de contrôler la réponse immune (Fooksman et al., 2010; Land, 2018). Une liste exhaustive des molécules de costimulation, de co-inhibition et d'adhésion est présentée dans les revues (Chen and Flies, 2013; Dustin, 2014).

Enfin, la sécrétion de cytokines, telles qu'IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IFN β , TNF α par les DC constitue le troisième signal indispensable à la survie, la prolifération et la polarisation des LT (Blanco et al., 2008).

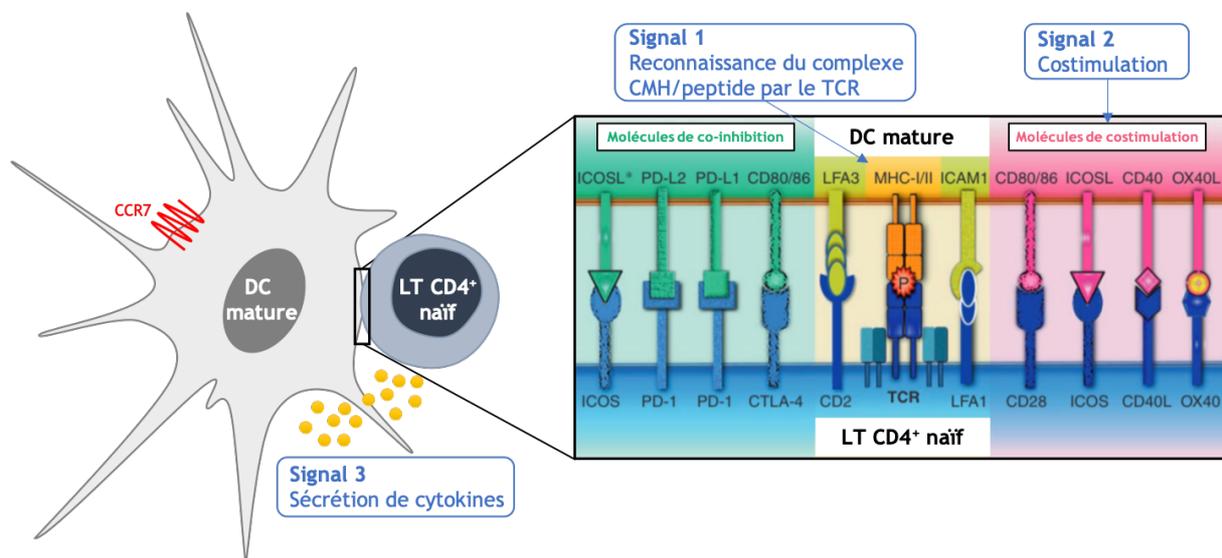


Figure 17 : Synapse immunologique entre la cellule dendritique et le lymphocyte T.

Adapté de (Land, 2018)

2.2. Polarisation des lymphocytes T

La sécrétion des cytokines par les DC et le microenvironnement cellulaire influencent l'orientation de la réponse lymphocytaire. Ainsi, un LT CD4⁺ naïf peut se différencier en lymphocytes Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, T folliculaire (T_{FH}) ou T régulateur (Treg).

Les cytokines sécrétées par les DC induisent l'expression de facteurs de transcription spécifiques dans les LT. Ces facteurs de transcription sont en effet responsables de l'activation ou de la répression d'autres facteurs de transcription au sein de la cellule favorisant ainsi la

sécrétion de cytokines effectrices spécifiques de la polarisation des LT. Il est cependant important de noter que les LT ont une plasticité importante et que leur orientation peut être modifiée en fonction des cytokines présentes dans leur microenvironnement (Chalmin et al., 2018).

La sécrétion d'IL-12 par les DC est l'un des facteurs principaux favorisant la transcription du facteur T-bet nécessaire à la polarisation Th1 des LT. Toutefois, d'autres cytokines telles que les interférons de types I et la chimiokine CXCL10 permettent également la polarisation Th1. Ces LT sont notamment caractérisés par la sécrétion d'IFN- γ (Walsh and Mills, 2013). L'orientation vers un phénotype Th2, avec la transcription de GATA-3 et la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13, est principalement induite en présence d'IL-4. D'autres cytokines et chimiokines peuvent aussi être impliqués telles que l'IL-2, CCL17 et CCL22 (Chalmin et al., 2018; Scheu et al., 2017). Les Th2 peuvent également sécréter de l'IL-9, cependant cette cytokine est notamment produite par la population de Th9 induite en réponse au TGF- β et à l'IL-4 (Kaplan et al., 2015). Par ailleurs, les Th17 peuvent être induits en présence d'IL-23, d'IL-6 et de TGF- β . Ces cytokines favorisent la transcription du facteur ROR γ t induisant ainsi la sécrétion d'IL-17, IL-21 et IL-22. L'IL-22 peut également être sécrétée par les Th22 dont la polarisation est notamment induite en présence d'IL-6 et de TNF α (Walsh and Mills, 2013). Enfin, l'orientation des LT vers un profil T_{FH} est induite en présence d'IL-6 et d'IL-21. La production d'IL-21 par ces cellules aide à l'activation des LB au niveau des centres germinatifs (Walsh and Mills, 2013).

Les cytokines polarisantes, les facteurs de transcription spécifiques de chaque profil de LT, les cytokines sécrétées par ces LT suite à leur différenciation ainsi que le rôle des LT dans la réponse immunitaire en fonction de leur orientation sont résumés dans la figure 18.

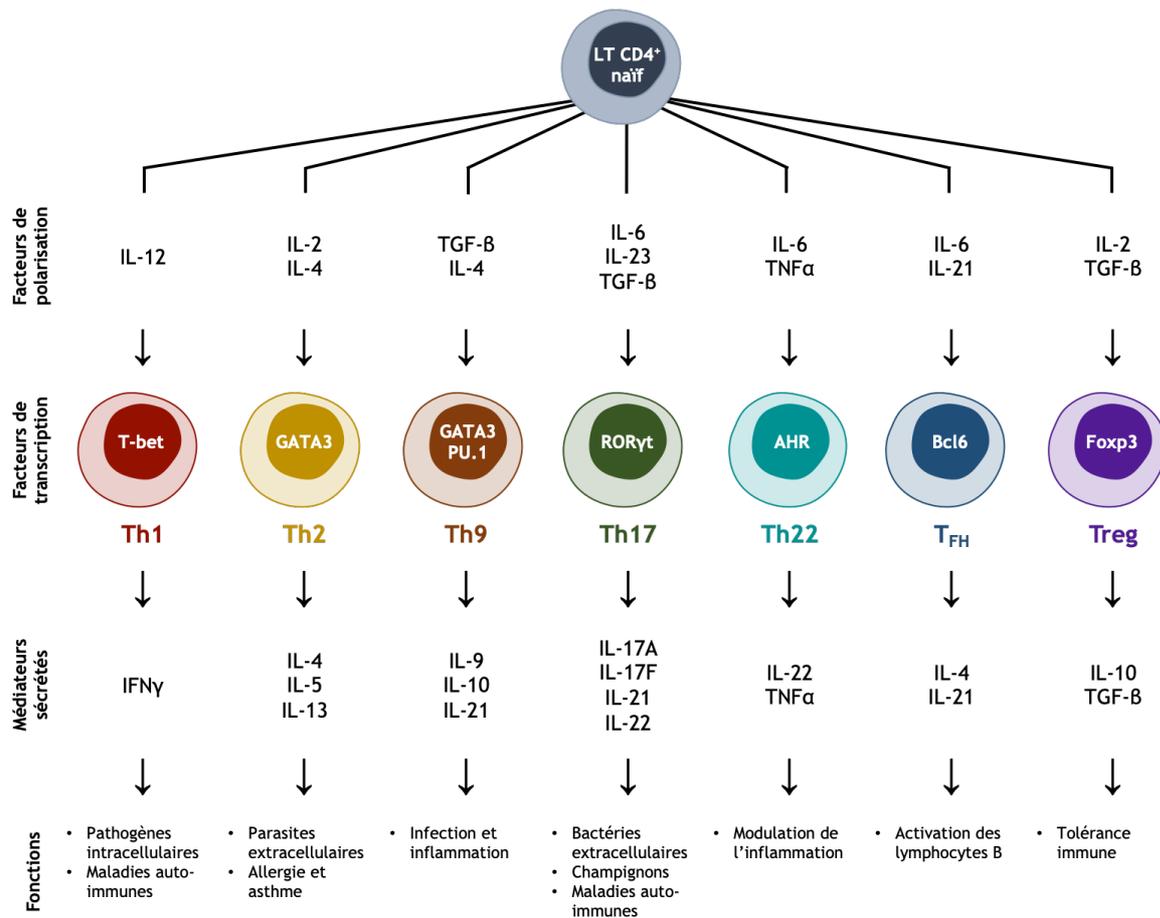


Figure 18 : Polarisation des lymphocytes T.

Adapté de (Chalmin et al., 2018; Kaplan et al., 2015; Plank et al., 2017; Zhu and Paul, 2008)

AHR : aryl hydrocarbon receptor ; Bcl6 : B-cell lymphoma 6 ; Foxp3 : forkhead box P3 ; GATA3 : GATA binding protein 3 ; ROR γ t : retinoic acid-related orphan receptor gamma t ; T-bet : T-box-containing protein expressed in T cells ; TGF- β : transforming growth factor beta.

Dans le cadre de l'étude de la réponse lymphocytaire aux anticorps thérapeutiques et leurs agrégats, la prolifération des LT et la sécrétion de cytokines ont été évaluées au cours de différentes études en se basant sur les modèles de co-cultures de DC et LT (autologues ou allogéniques) ou sur les modèles de culture de PBMC.

Les cultures de PBMC humaines ont montré une augmentation de la prolifération des LT et de la production d'IL-2 (Joubert et al., 2016; Schultz et al., 2017) ou d'IFN- γ (Rombach-Riegraf et al., 2014), évaluée par la technique ELISpot, en réponse aux agrégats d'anticorps, alors que les anticorps natifs induisaient peu ou pas de réponse.

Par ailleurs, une étude réalisée au sein de notre laboratoire a montré que les agrégats de protéines (GH recombinante humaine et rituximab) induisaient la maturation de moDC et que ces moDC matures pouvaient augmenter la prolifération de LT allogéniques. Cette même étude a montré une augmentation de la sécrétion des cytokines IFN- γ , IL-5, IL-13 et IL-17 par les LT en présence d'agrégats de rituximab, alors que les agrégats de GH n'induisaient que l'augmentation de la sécrétion de l'IFN- γ par les LT suggérant qu'il existe différents mécanismes impliqués dans l'activation des DC et des LT en fonction de l'origine des agrégats (Gallais et al., 2017).

D'autre part, l'évaluation de la réponse lymphocytaire chez des patients a permis de mieux comprendre le rôle des LT dans l'immunogénicité des anticorps thérapeutiques. Dans le cas de traitement par l'infliximab, Vultaggio et collaborateurs ont montré dans un modèle de co-culture autologue de moDC et de LT que les patients ayant développé des ADA présentaient un profil cytokinique mixte d'IFN- γ , IL-13 et IL-10. Par contre, chez les patients ADA-, la cytokine immunosuppressive IL-10 était la plus sécrétée. Plus récemment, cette même équipe a montré que le développement d'ADA chez ces patients est accompagné d'une réduction précoce de la sécrétion d'IL-10 et d'une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ (Pratesi et al., 2019). De plus, il a été observé que la prolifération des LT chez les patients manifestant des réactions d'hypersensibilité était supérieure à celle observée chez les patients non répondeurs et les patients tolérants. Enfin, cette étude a également montré que parmi les patients ayant eu des réactions d'hypersensibilité, ceux qui étaient IgE+ induisaient une production plus importante d'IL-13 que les patients IgE- (Vultaggio et al., 2016).

2.3. Réponse régulatrice des lymphocytes T

En plus de leur capacité à induire une réponse immunitaire adaptative efficace à travers l'activation de LT effecteurs, les DC participent au maintien de l'homéostasie immunitaire et de la tolérance périphérique par l'activation des LT régulateurs. Les Treg constituent 5 à 10 % du pool de LT CD4⁺ totaux et peuvent être issus du thymus (ils sont dits thymiques, tTreg) ou être induits à partir de LT conventionnels en périphérie (pTreg) (Georgiev et al., 2019). Les Treg, naturels et induits, ont d'abord été identifiés par l'expression du CD25, chaîne α du récepteur à l'IL-2, et du facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box P3*). Parmi les pTreg, il existe également des sous-populations de lymphocytes Th3, sécrétant du TGF- β , et Tr1, sécrétant de l'IL-10. Par ailleurs, le facteur de transcription Foxp3 pouvant être exprimés sur des LT effecteurs, plusieurs marqueurs sont actuellement étudiés pour distinguer les différentes population de Tregs tels que Foxp3, CD25, CD127, CD45RO et CD45RA (Yuan and Malek, 2012).

Les DC tolérogènes sécrètent du TGF- β et de l'IL-10 et expriment des marqueurs de co-inhibition qui vont favoriser la polarisation des LT en Treg. Ces cellules régulatrices expriment fortement des molécules inhibitrices telles que CTLA-4, indispensables pour réduire la capacité stimulatrice des DC immunogènes et rétablir la tolérance périphérique (Wing et al., 2008).

Le maintien de la tolérance chez des patients traités par l'infliximab a été montré dans une étude, par la mise en évidence d'une production accrue d'IL-10 par des LT de patients mis en culture avec des moDC autologues traitées avec l'infliximab. De plus, cette étude a permis de vérifier l'activité immunosuppressive de l'IL-10, en montrant que les clones de LT producteurs avaient un phénotype régulateur (TCR $\alpha\beta$ ⁺CD3⁺CD4⁺Foxp3⁺CD39⁺CD73⁺), et inhibaient la prolifération de LT effecteurs spécifiques de l'infliximab (Vultaggio et al., 2017).

3. Présence d'un répertoire de lymphocytes T reconnaissant l'antigène

La maturation des DC est une étape clé du processus de déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative. Cependant, la présence d'un répertoire de LT capable de reconnaître l'antigène est indispensable pour l'activation des LT induite par la reconnaissance par le TCR du complexe CMH/peptide qui lui est spécifique.

3.1. Développement du répertoire des lymphocytes T

Le répertoire lymphocytaire correspond à l'ensemble des lymphocytes d'un individu pouvant reconnaître des antigènes divers. La diversité du répertoire de LT fait qu'un LT est capable de reconnaître un (ou plusieurs) peptide antigénique donné via un TCR en surface qui est spécifique pour cet antigène. Le TCR est formé par l'appariement de deux chaînes polypeptidiques α et β (et plus rarement γ et δ) qui sont codées par les gènes V (variable), D (diversité, uniquement pour les chaînes β et δ), J (jonction) et C (constant). La diversité du TCR résulte de la recombinaison aléatoire de ces différents gènes, et donc un TCR $\alpha\beta$ est composé d'une combinaison unique de V α , J α et C α pour la chaîne α et de V β , J β , D β et C β pour la chaîne β . Les régions variables des chaînes α et β exposent trois domaines hypervariables qui vont permettre l'interaction avec le complexe CMH/peptide : CDR1 et CDR2 interagissent avec la molécule du CMH et CDR3 avec le peptide (Zarnitsyna et al., 2013).

Toutefois, l'obtention de TCR fonctionnels qui ne reconnaissent que les épitopes du non-soi nécessite une étape supplémentaire de sélection thymique au cours de laquelle plus de 95 % des thymocytes sont éliminés. Ainsi, au cours de leur développement, les thymocytes passent par plusieurs étapes allant de précurseurs doubles négatifs (DN) pour le CD4 et le CD8 vers des précurseurs doubles positifs (DP) pour enfin aboutir à des précurseurs simples positifs (SP) CD4⁺ ou CD8⁺. Dans le cortex thymique, les thymocytes DP vont interagir avec les cellules corticales épithéliales (cTEC pour *cortical thymic epithelial cells*). À ce niveau, les thymocytes

dont le TCR est capable de reconnaître avec une affinité suffisante les molécules du CMH reçoivent un signal de survie ; cette étape correspond à la sélection positive. Après migration vers la médulla, les thymocytes rentrent en contact avec les cellules épithéliales médullaires (mTEC pour *medullar thymic epithelial cells*) et les DC thymiques qui présentent les antigènes du soi sur les molécules du CMH. La sélection négative à ce niveau permet d'éliminer les thymocytes ayant une forte affinité pour les antigènes du soi. La majorité de ces LT auto-réactifs sont éliminés par apoptose, alors qu'une faible proportion survit et se différencie en LT régulateurs (Figure 19). Ainsi, moins de 5 % des lymphocytes reçoivent un signal de survie, arrivent à maturité et migrent en périphérie pour former le répertoire périphérique de LT naïfs (Klein et al., 2014; Takaba and Takayanagi, 2017).

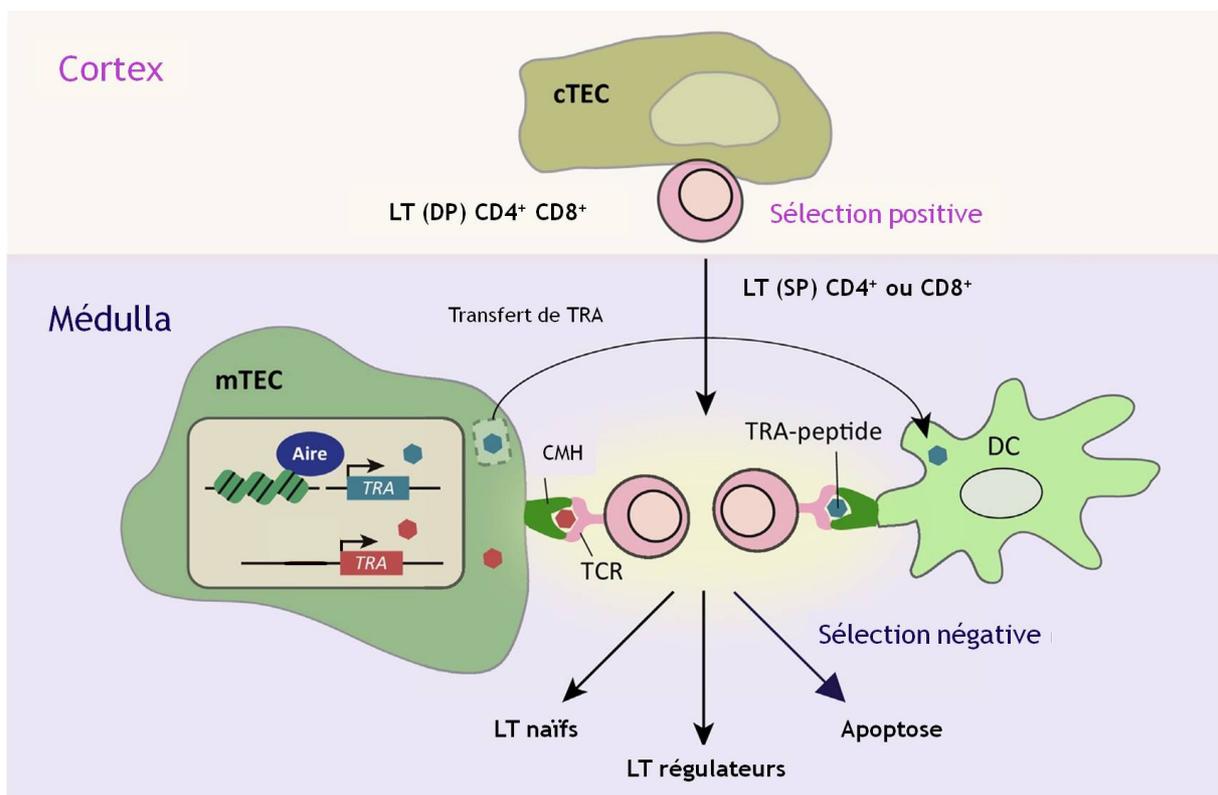


Figure 19 : Étapes de la sélection thymique induisant le développement du répertoire des lymphocytes T.

Adapté de (Takaba and Takayanagi, 2017)

Aire : *Auto-Immune REgulator* ; cTEC : cellules corticales épithéliales ; DP : double positif ; LT : lymphocytes T ; mTEC : cellules médullaires épithéliales ; SP : simple positif ; TRA : *tissue-restricted antigen* (peptide spécifique de tissus)

Ces LT sont qualifiés de naïfs tant qu'ils n'ont pas rencontré leur antigène spécifique et ils expriment notamment les marqueurs de surface CD45RA, CD62L, CD27, CD28 et CCR7 (Kohler and Thiel, 2009).

Il est important de préciser que certains LT autoréactifs échappent à la tolérance centrale et migrent en périphérie. Toutefois, des mécanismes de tolérance périphérique (tels que l'anergie et les Tregs), sont mis en place pour éviter le développement de réactions auto-immunes (Xing and Hogquist, 2012).

Les différents processus de réarrangement génique et de sélection thymique nécessaires pour la génération de TCR fonctionnels et spécifiques font que la diversité des TCR $\alpha\beta$ est estimée à plus de $2,5 \times 10^7$ chez l'homme (Zarnitsyna et al., 2013).

3.2. Répertoires T contre les anticorps thérapeutiques monoclonaux

Comme précisé dans le chapitre 1 (paragraphe 4.1.1, présence d'épitopes T), l'utilisation d'un modèle de co-culture de LT et moDC autologues de donneurs sains a permis de mettre en évidence l'existence d'un répertoire de LT reconnaissant des peptides dérivant des anticorps monoclonaux (notamment rituximab, infliximab et adalimumab) (Delluc et al., 2011). Il a également été montré que des épitopes T issus des régions variables du rituximab et de l'infliximab présentent une bonne affinité pour se lier aux molécules HLA-DR et peuvent induire une réponse lymphocytaire quand ils sont testés sur des cellules issus de donneurs sains. De plus, et de manière intéressante, l'étude de la réponse des LT de patients ayant développé des ADA a montré que certains épitopes (8 de 9 épitopes pour l'infliximab et 4 de 9 épitopes pour le rituximab) détectés comme immunogènes chez les donneurs sains participaient à l'augmentation de la sécrétion des cytokines IL-5, IFN- γ , IL-17 et IL-10, bien que celle-ci soit variable selon les patients, montrant ainsi une hétérogénéité de la réponse (Hamze et al., 2017). Une autre étude a également mis en évidence une réponse T spécifique de l'infliximab chez des

patients ADA+. En utilisant le modèle de co-cultures autologues, il a été possible de montrer une prolifération augmentée des LT des patients ADA+ ainsi qu'une augmentation de la production d'IFN- γ , IL-13 et IL-10 (Vultaggio et al., 2016). Ces résultats montrent que la réponse T CD4⁺ développée chez les patients présentant des ADA repose pour partie sur un répertoire naïf préexistant.

4. Mise en place de la réponse lymphocytaire B

La production d'anticorps est un des aboutissements de la réponse immunitaire adaptative induite par l'immunisation à un antigène. La détection d'ADA de haute affinité (notamment des IgG) chez les patients traités par les anticorps thérapeutiques nécessite l'activation et la maturation des LB avec l'aide de LT CD4⁺ spécifiques de l'anticorps en question.

Comme préalablement décrit, une réponse immunitaire classique se traduit par la prise en charge de l'antigène par les DC qui le présente aux LT CD4⁺ spécifiques au niveau du ganglion lymphatique pour induire leur prolifération et leur polarisation. L'antigène parvient également à atteindre les organes lymphoïdes secondaires où il entre en contact avec les LB qui possèdent à leur surface une immunoglobuline spécifique de l'antigène, le BCR (B cell receptor). L'interaction du BCR avec l'antigène dont il est spécifique va induire l'activation du LB et l'internalisation de l'antigène par endocytose, son apprêtement et son chargement sur les molécules du CMH de classe II (Roche and Furuta, 2015). Une fois activés, les LB vont entrer en contact avec les lymphocytes T_{FH} spécifiques de l'antigène et préalablement activés par les DC. L'interaction des LT_{FH} et des LB se traduit par la formation d'une synapse immunologique où le TCR se lie au complexe CMH/peptide, les molécules de co-stimulation se lient à leur ligand (par exemple le ligand du CD40 (CD40L) sur les LT se lie au CD40 exprimé par les LB) et des cytokines telles que l'IL-4, IL-21 et BAFF (B cell activating factor) sont sécrétées par les LT. Ces différents signaux sont impliqués dans la synthèse de facteurs de survie, de

prolifération et de différenciation des LB en LB mémoires et en plasmocytes (Crotty, 2011; Suan et al., 2017).

La différenciation des LB est accompagnée d'une modulation de l'affinité des immunoglobulines pour l'antigène grâce à des hypermutations somatiques dans les gènes codant les domaines variables des immunoglobulines. Suite à la sélection positive des LB portant une immunoglobuline de forte affinité pour l'antigène, une étape de commutation isotypique permet l'obtention d'immunoglobulines d'une nouvelle classe (IgG, IgA ou IgE) et qui ont une haute affinité pour l'antigène (Biram et al., 2019).

Selon les cytokines du microenvironnement, les plasmocytes produiront des anticorps d'isotypes différents. Par exemple, l'IL-4 va notamment favoriser la sécrétion d'IgG1 et d'IgE alors que l'IFN- γ inhibe la sécrétion de l'IgG1 mais augmente celle de l'IgG2a (Vazquez et al., 2015). La production d'anticorps d'un isotype donné varie également en fonction de l'antigène. Ainsi, en réponse à un antigène protéique, des IgG1 et IgG3 sont majoritairement produites, alors que la réponse à un antigène polysaccharidique est associée à la sécrétion d'IgG2 et IgG4. Les IgE quant à elles sont associées aux hypersensibilités et allergies et les IgA aux réponses humorales des muqueuses pour la protection de l'hôte des pathogènes (Schroeder and Cavacini, 2010).

Dans les cas d'immunisation aux anticorps thérapeutiques, les ADA détectés sont notamment des IgG et plus particulièrement des IgG1 et IgG4 (Krishna and Nadler, 2016; Vultaggio et al., 2018). Toutefois, il est possible de détecter des IgE chez les patients présentant des réactions d'hypersensibilité suite à la perfusion d'un anticorps. Des IgE ont ainsi été détectées dans le cas de l'immunisation à l'infliximab et le rituximab (Vultaggio et al., 2010, 2012). Il est important de noter que les ADA sont dans la majorité des cas dirigés contre des épitopes des fragments variables des anticorps notamment au niveau du paratope. Ceci a notamment été observé dans le cas de l'infliximab et l'adalimumab (Homann et al., 2015, 2017; van Schie et al., 2015).

Enfin, dans le cas des agrégats d'anticorps, plusieurs études *in vivo* décrites dans le chapitre 2 ont montré que l'injection d'agrégats d'anticorps induisaient une production d'ADA (notamment d'isotype IgG). Une étude récente s'intéressant aux épitopes B a montré que les IgG détectées chez des souris immunisées par des agrégats d'un fragment variable d'un anticorps à chaîne unique (scFv, pour single chain antibody variable fragment) sont spécifiques d'épitopes spécifiques des agrégats. En effet, ces peptides sont localisés à l'interface entre les domaines variables des chaînes lourdes et légères qui devient exposé suite au dépliement subi au cours de l'agrégation (Eyes et al., 2019).

PRÉSENTATION DU TRAVAIL

Malgré les avancées dans le domaine des biothérapies, l'immunisation des patients contre leur traitement reste une limite majeure. En effet, l'apparition d'anticorps dirigés contre le biomédicament (ADA) chez les patients est souvent associée à la neutralisation de ce dernier, et à une perte de la réponse clinique, ou encore à des réactions d'hypersensibilité. L'immunogénicité des protéines à visée thérapeutique est favorisée par différents facteurs liés au statut immunitaire ou génétique du patient, au schéma thérapeutique, aux traitements immunosuppresseurs associés, ainsi qu'aux caractéristiques intrinsèques du produit. Parmi ces dernières, la présence d'agrégats de protéines dans le produit administré favoriserait le développement d'ADA.

Alors que la formation d'agrégats est évitée au cours de la fabrication du biomédicament, elle n'est plus contrôlée une fois les lots cliniques libérés. Les agrégats protéiques peuvent se former à l'issue de différents stress que peut subir le produit au cours du stockage, du transport et même lors de la reconstitution et l'administration au patient. Seule l'inspection visuelle à ce stade permet de constater leur présence, par conséquent les agrégats dits subvisibles ne sont pas détectés. Certaines études montrent que les agrégats de protéines peuvent jouer le rôle de signal de danger et être reconnus par des cellules présentatrices d'antigène professionnelles telles que les DC, conduisant à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative dépendante des LT CD4⁺, et dont l'étape ultime est la production d'ADA de haute affinité par des LB spécifiques. Toutefois, l'interaction des agrégats avec les cellules immunitaires innées, les mécanismes intracellulaires induits, ainsi que l'effet sur la réponse lymphocytaire restent peu documentés.

L'objectif de ce travail est donc d'approfondir notre compréhension du rôle des agrégats de protéines dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative spécifique, en évaluant l'interaction des agrégats avec les DC et les conséquences sur la réponse des LT CD4⁺.

Pour ce faire, l'inflximab, anticorps monoclonal chimérique anti-TNF α , a été choisi comme modèle pour la préparation des agrégats de notre étude en raison de son immunogénicité et de sa susceptibilité à l'agrégation. Différents types de stress thermiques et de lumière ont été testés pour induire la formation d'agrégats. La caractérisation des préparations par des méthodes physico-chimiques orthogonales a permis de déterminer pour chaque solution la quantité de monomères restante et d'estimer la quantité, la structure et la taille des agrégats formés.

Dans la première partie du travail, nous avons étudié les mécanismes de signalisation cellulaires précoces impliqués dans le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative. Pour cela, nous avons d'abord montré que des agrégats d'inflximab, formés sous stress thermique, induisaient la maturation de DC humaines dérivées de monocytes (moDC). Cet effet a été observé en mesurant l'expression de marqueurs d'activation et de costimulation à la surface des moDC ainsi que la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Nous avons également montré, à travers des co-cultures allogéniques de moDC et de LT CD4⁺, que ces modifications phénotypiques induites par les agrégats favorisaient la prolifération de LT CD4⁺ et la production de cytokines. Par la suite, nous nous sommes focalisés sur le Fc γ RIIa et sur la tyrosine kinase Syk pour évaluer le rôle de ces deux protéines dans la réponse cellulaire induite par les agrégats. Le Fc γ RIIa est le récepteur le plus exprimé sur les moDC parmi les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines G (Fc γ R) activateurs et son engagement induit l'activation de Syk. Ainsi en utilisant un anticorps bloquant spécifique du Fc γ RIIa et un inhibiteur pharmacologique spécifique de Syk, nous avons montré l'implication de la voie Fc γ RIIa-Syk dans la maturation des moDC et l'activation des LT CD4⁺ (**Article 1**, soumis au *Journal of Immunology*).

La deuxième partie de ce travail a consisté à évaluer le rôle des agrégats d'inflximab dans la génération de nouveaux épitopes en utilisant un modèle de co-culture autologue de moDC et de LT CD4⁺ naïfs issus de donneurs sains. Deux préparations d'agrégats ont été choisies pour

cette étude. D'une part, nous avons testé des agrégats d'infliximab produits sous stress thermique et qui n'induisaient pas d'activation des moDC détectable par l'expression des marqueurs membranaires d'activation et de costimulation. Le marquage de ces agrégats a montré qu'ils pouvaient être internalisés par les moDC. La co-culture de LT CD4⁺ naïfs avec des moDC chargées avec ces agrégats d'infliximab a permis de mettre en évidence l'existence d'un répertoire de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant spécifiquement les agrégats d'infliximab chez 5 donneurs sains. De manière intéressante, la fréquence de LT CD4⁺ naïfs spécifiques des agrégats d'infliximab était plus élevée que celle retrouvée pour l'anticorps natif chez les différents donneurs testés. Par ailleurs, des préparations d'agrégats d'infliximab générés sous stress de lumière UV et constitués de dimères et d'oligomères solubles ont également été testées. Des résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence l'existence de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant ces agrégats. Au total, cette étude permet de suggérer que la présence d'agrégats d'anticorps induirait des modifications dans la présentation d'antigène par les DC en termes de quantité et de variété (**Résultats complémentaires**).

RÉSULTATS

**Partie I : Mécanismes de l'activation des cellules dendritiques
humaines et des lymphocytes T par les agrégats d'infliximab**

Article

Activation des cellules dendritiques humaines et des lymphocytes T en réponse aux agrégats d'infliximab dépendante de la voie FcγRIIa-Syk

The FcγRIIa-Syk axis controls human dendritic cells activation and T cell response in response to infliximab aggregates.

Myriam Nabhan, François-Xavier Legrand, Minh Thang Le, Baptiste Robin, Rami Bechara, Nicolas Huang, Claire Smadja, Marc Pallardy and Isabelle Turbica on behalf of the ABIRISK Consortium

Article soumis au Journal of Immunology.

L'objectif de ce premier travail était de mieux comprendre les événements cellulaires précoces de l'activation des DC induite par les agrégats protéiques, permettant d'induire la réponse lymphocytaire.

Pour cela, nous avons d'abord établi un modèle d'agrégats à partir d'un anticorps thérapeutique chimérique anti-TNF α , l'infliximab (IFX), susceptible à l'agrégation et provoquant l'immunisation de 17 à 58 % des patients traités. Nous avons produit des agrégats en soumettant l'IFX à une température élevée (*heat stress*) puis nous les avons caractérisés par trois méthodes orthogonales : chromatographie d'exclusion stérique (SEC), diffraction dynamique de la lumière (DLS) et microscopie par imagerie de flux (MFI). Les résultats de caractérisation ont confirmé la formation d'agrégats avec une fraction majoritaire de particules de taille variant entre 5 et 15 μm .

Par la suite, nous avons montré que ces agrégats d'IFX induisaient la maturation de DC différenciées *in vitro* à partir de monocytes issus de donneurs sains (moDC) par une augmentation de l'expression des molécules de surface CD80, CD86, CD83, PD-L1 et CXCR4 et de la sécrétion de cytokines et chimiokines inflammatoires. Ensuite en utilisant un modèle

de co-cultures allogéniques, nous avons montré que les moDC stimulées par les agrégats d'IFX induisaient une augmentation de la prolifération des LT CD4⁺ et de la production des cytokines IL-5, IL-9 et IL-13.

Afin d'étudier les voies intracellulaires précoces impliquées dans la reconnaissance des agrégats et dans l'activation des moDC, nous nous sommes focalisés sur le FcγRIIa, qui est celui le plus exprimé sur les moDC parmi les FcγR activateurs. Nous avons montré que la neutralisation de ce récepteur inhibait l'activation des moDC induites par les agrégats d'IFX. L'engagement du FcγRIIa par les agrégats suppose le recrutement et la phosphorylation de la tyrosine kinase Syk qui induit à son tour l'activation de différentes cascades de signalisation impliquées dans la présentation de l'antigène, l'expression de molécules de surface ainsi que la sécrétion de cytokines et chimiokines. En effet, nos résultats ont montré que les agrégats d'IFX augmentaient la phosphorylation de Syk mais que l'inhibition de cette kinase induisait une perte de l'activation des moDC. Enfin, nous avons pu confirmer l'implication de cette voie dans la réponse lymphocytaire en montrant que l'inhibition de Syk dans les moDC entraînait une réduction de la prolifération des LT et de la production de cytokines en réponse aux agrégats. En résumé, cette étude nous a permis de montrer pour la première fois que la réponse lymphocytaire aux agrégats d'anticorps était dépendante de l'activation des DC induite via la voie FcγRIIa-Syk.

The FcγRIIIa-Syk axis controls human dendritic cells activation and T-cell response induced by infliximab aggregates ¹

Myriam Nabhan *, François-Xavier Legrand †, Victor Le-Minh †, Baptiste Robin †, Rami Bechara *, Nicolas Huang †, Claire Smadja †, Marc Pallardy * and Isabelle Turbica * on behalf of the ABIRISK Consortium

* Inflammation Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, LabEx LERMIT, Fac. de pharmacie - Univ.Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France.

† Institut Galien Paris Sud, UMR CNRS 8612, Univ. Paris-Sud, Univ. Paris-Saclay, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.

Corresponding Author: isabelle.turbica@u-psud.fr; +33(0)146835299

Running Title: FcγRIIIa/Syk-dependent immune response to antibody aggregates

Keywords: immunogenicity, aggregation, dendritic cells, T cells, protein kinases, Fc receptors, antibodies, cell signaling

Abbreviations: DC: dendritic cells; IFX: infliximab; FcγRIIIa: Fc gamma receptor IIIa; hs: heat stress; moDC: monocyte-derived dendritic cells; Syk: spleen tyrosine kinase; Th: T helper, DLS: dynamic light scattering

Conflict of interest: The authors state no conflict of interest.

¹ This work has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking (IMI JU) under grant agreement no. [115303], ABIRISK “Anti-Biopharmaceutical Immunization: Prediction and Analysis of Clinical Relevance to Minimize the Risk”, resources of which are composed of financial contribution from the European Union’s Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and EFPIA companies’ in kind contribution.

ABSTRACT

The development of anti-drug antibodies (ADA) in response to biological products (BP) is a major drawback in the treatment of patients. Factors related to the patient, the treatment as well as to the product can influence BP immunogenicity. Among these factors, BP aggregates have been suggested to promote immunogenicity by acting as danger signals recognized by dendritic cells (DC) facilitating the establishment of an anti-BP CD4 T-cell dependent adaptive immune response leading to ADA production. To date, little is known on the mechanism supporting the effect of aggregates on DC and consequently on the T-cell response. The aim of this work was to identify key signaling pathways involved in BP aggregates DC activation and T-cell response. We generated aggregates by submitting infliximab (IFX), an immunogenic anti-TNF- α chimeric antibody, to heat stress. Our results showed that IFX aggregates were able to induce human monocyte-derived DC (moDC) maturation in a concentration-dependent manner. Aggregates-treated moDC enhanced allogeneic T-cell proliferation and IL-5, IL-9 and IL-13 production compared to native antibody-treated moDC. We then investigated the implication of Fc γ RIIa and spleen tyrosine kinase (Syk) in DC activation and showed that they were both strongly implicated in moDC maturation induced by IFX aggregates. Indeed, we found that neutralization of Fc γ RIIa inhibited DC activation and consequently Syk inhibition lead to a decrease of T-cell proliferation and cytokine production in response to IFX aggregates. Taken together our results bring new insight on how protein aggregates could induce dendritic cell and T cell activation via the Fc γ RIIa-Syk signaling pathway.

INTRODUCTION

Over the past 20 years, tumor necrosis factor (TNF)- α inhibitors have been used in the treatment of chronic immune-mediated diseases such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease (1, 2). Although anti-TNF antibodies have proven their efficacy in the treatment of these diseases, some patients fail to respond favorably to these bioproducts (primary non-response) or fail to maintain their response after initial efficacy (secondary non-response) (3). The latter case is mainly due the development of anti-drug antibodies (ADA) with potential neutralizing capacities leading to loss of clinical response and relapse of disease (3). The first developed anti-TNF antibody was infliximab (IFX), a chimeric monoclonal IgG1. IFX is an immunogenic antibody with 17 to 58 % of treated patients developing ADA within the first 12 to 15 months of therapy, depending on the treated disease and the sensitivity of the assay used to measure ADA (4–6).

Among other factors, the quality of the product can influence the immunogenicity of biologics. In fact, the presence of protein aggregates in therapeutic products has been correlated with ADA production in mouse models either on wild type or transgenic animals (7, 8) and it has been shown that aggregates could play the role of danger signals facilitating T-cell dependent immune responses in *in vitro* models (9, 10). These results suggested that aggregates could be recognized by professional antigen presenting cells, such as dendritic cells (DC), inducing their maturation and the activation of CD4⁺ T cells and thus helping B cell maturation and production of high affinity ADA (7). Indeed, stability of IFX can be involved in its immunogenicity since it was recently shown that the Fab domains of this antibody tend to self-associate, potentiating the possibility of IFX aggregates formation (11). There is currently few data regarding how aggregates can interact with DC and what are the main signaling pathways leading to T-cell activation by aggregates-treated DC. It has been suggested that aggregated monoclonal antibodies could engage different types of cell surface

receptors to induce immune cells activation (12). Joubert *et al.* showed the implication of toll-like receptors (TLR2 and TLR4) and Fc receptors (Fc γ RI and Fc γ RIII) in the activation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by antibody aggregates (12). We recently showed that the activation of human monocyte-derived dendritic cells (moDC) induced by growth hormone aggregates was dependent on intracellular pathways (Rac1 and phosphoinositide 3-kinase) implicated in actin remodeling and phagocytosis (13). However, given their nature, antibody aggregates could bind, like immune complexes, to activating Fc γ receptors.

The human Fc γ R family is composed of five activating receptors, namely Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32a), Fc γ RIIc (CD32c), Fc γ RIIIa (CD16a) and Fc γ RIIIb (CD16b) and of one inhibiting receptor Fc γ RIIb (CD32b). Fc γ RI is the only receptor having high affinity for monomeric IgG, as the other receptors display low affinity and bind preferentially to immune complexes and aggregated IgG (14). Human DC and *in vitro* generated moDC mainly express the activating Fc γ RIIa and the inhibitory Fc γ RIIb (15–17). The engagement of an activating Fc γ R induces tyrosine phosphorylation of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) followed by the recruitment and activation of spleen tyrosine kinase (Syk) (18, 19). Syk phosphorylation can then lead to the activation of multiple downstream signaling pathways, such as PI3K/Akt, Ras/ERK, PLC γ /NFAT, Vav-1/Rac and IKK/NF- κ B. These signaling pathways contribute to the activation of immune cells and the release of cytokines (18, 20). Recent studies have shown that depending on the therapeutic protein and the applied stress, the structure, size and quantity of generated aggregates as well as the immune cell response can be different (12, 21). This strongly suggests that the mechanisms behind DC activation and the signaling pathways triggered can vary depending on the type of generated aggregates and the cellular receptors that are engaged. In the present work, we addressed the early events in moDC signaling that control the T cell response induced by heat stress-IFX

aggregates, assuming the engagement of Fc γ R. Our results highlighted the involvement of Syk via Fc γ RIIa in the regulation of moDC activation, along with the consequences on the proliferation of CD4⁺ T cells and their cytokine production. This study brings us a step closer to understanding how protein aggregates can be key players in the T-dependent immune response.

MATERIALS AND METHODS

Samples preparation

Lyophilized infliximab (Remicade[®], IFX) was commercially available, and reconstituted to a final concentration of 10 mg.mL⁻¹ with sterile water. To induce the formation of aggregates, samples were submitted to a heat stress at 55°C for 24 h. Aliquots of samples were then stored at -80°C until use. Aggregate stability was checked by size measurements using dynamic light scattering after freezing and thawing and no modifications were recorded.

Endotoxin was quantified for each native or aggregated product by using a colorimetric assay (ToxinSensor, Genscript, Paris, France), according to the manufacturer's instructions. This assay kit can detect endotoxin concentration in the range of 0.01 to 1 endotoxin units per milliliter (EU.mL⁻¹). Levels of endotoxin were considered acceptable under the limit of 0.25 EU.mL⁻¹.

Characterization of native and heat-stressed infliximab

Size exclusion chromatography (SEC). SEC-Laser induced fluorescence (LIF) experiments were carried out using a 1260 Agilent UPLC, and a 1260 LIF detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A column Agilent Bio SEC-3 (3µm, 300 Å, 4.6 x 300 mm) was employed (Temperature 25 °C). The mobile phase (100 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 5% isopropanol, pH 7.0) was isocratically pumped at 300 µL.min⁻¹. LIF detection was monitored by Fluorescence detector (λ_{ex} = 280 nm, and λ_{em} 350 nm). Aggregates samples were centrifuged to remove visible and insoluble particles and then diluted ten-fold before injecting 20 µL for separation. Sodium phosphate and sodium chloride were purchased from Fisher Scientific (Karlsruhe, Germany) and from Euromedex (Souffelweyersheim, France), respectively. HPLC grade isopropanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Dynamic light scattering. The size distribution of native and aggregated IFX was determined at 25°C by Dynamic Light Scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern

Instruments, Orsay, France) operating at a fixed scattering angle of 90° and equipped with a laser source of wavelength 633 nm. Measurements were performed in disposable microcuvettes with four optical faces (Eppendorf® UVette®) containing an appropriate volume of sample prepared as above (0.1 mL) or diluted in ultrapure water to a concentration of 1.0 mg.mL⁻¹. The size profile was obtained from the volume-weighted distribution and the hydrodynamic diameter values were calculated using the Stokes-Einstein equation, assuming a spherical shape of the particles, and corresponded to the median diameter derived from the cumulative distribution curve. The polydispersity index was deduced from cumulant analysis. Values are given as mean values of three independent measurements.

Flow imaging microscopy. The aggregate size was studied by flow imaging microscopy, on a Flowcell FC200S+HR (Occhio, Belgium). Briefly, this apparatus captured images of the sample flowing in a cell, and the software Callisto (Occhio, Belgium) analyzed the shape and the size of each particle individually. A 400 µm-thick spacer was used, to be sure that even the largest aggregates could pass through the cell and the samples were magnified 2 times. Before each analysis, a background calibration was performed on ultrapure water. Furthermore, the sample initially at 10 mg.mL⁻¹ was diluted in ultrapure water to a concentration equal to 0.5 mg.mL⁻¹. The diluted sample was then deposited on top of the cell and pumped through it. From the captured images, size and shape information were extracted. As the aggregates looked anisotropic, “Length” was chosen as the most relevant size parameter for further descriptions. In brief, a Feret diameter is the distance between two parallel lines, both tangent to the particle shape. There are many Feret diameters for each particle, but the “Length” as defined in the software was the maximum Feret diameter. Polydispersity was given by the relative span index, which was calculated according to $\text{Span} = (d_{90} - d_{10})/d_{50}$ where d_{90} , d_{50} and d_{10} are the particle diameters determined respectively at the 90th, 50th and 10th percentile of undersized particles.

Generation of human monocyte-derived dendritic cells (moDC)

As previously described (9), monocytes were isolated from the mononuclear fraction by magnetic positive selection with MiniMacs separation columns and anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Monocytes were cultured at 1×10^6 cells.mL⁻¹ in the presence of GM-CSF (550 U.mL⁻¹) and IL-4 (550 U.mL⁻¹) (Miltenyi Biotec) in RPMI-1640 25 mM HEPES GlutaMAX™ supplemented with 10% fetal calf serum, antibiotics and 1% pyruvate at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Within 4 days, monocytes differentiated into moDC with an immature phenotype.

Treatment of moDC

On day 4, immature moDC were stimulated with 25, 50, 100 or 200 µg.mL⁻¹ of native or aggregated IFX and incubated at 37°C from 5 min to 24 h depending on experiments. In some experiments, moDC were pretreated for 1 h with Syk inhibitor IV (1 µM) or anti-FcγRIIa or IgG1 isotype control antibodies (1 µg.mL⁻¹). Syk inhibitor IV (Bay 61-3603) was purchased from Millipore (Massachusetts, USA) and anti-FcγRIIa (clone IV.3) and IgG1 isotype control antibodies were purchased from Stemcell (Vancouver, Canada).

Flow cytometric analysis of moDC maturation in response to infliximab aggregates

After 24 h of treatment with native or aggregated IFX, moDC viability and phenotype were analyzed by flow cytometry. Cell viability was assessed in preliminary experiments by Propidium iodide (PI) (Invitrogen, California, USA) staining, used at a final concentration of 625 ng.mL⁻¹, on a small fraction of moDC cultures. Cell viability after treatment was never less than 75%. For the phenotypic analysis, the surface labeling procedure was as follows: 2×10^5 cells per mL were washed in cold phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.5% bovine serum albumin (BSA) and stained with monoclonal antibodies (mAbs) in the dark, on ice for 20 min. The following mAbs were used: allophycocyanin (APC)-labeled mouse anti-human CD86 (555660, BD Biosciences, New Jersey, USA) and anti-human

CXCR4 (555976, 12G5, BD Biosciences); Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled mouse anti-human CD80 (5557226, L307.4, BD Biosciences) and anti-human PD-L1 (558065, MIH1 BD Biosciences); Phycoerythrin (PE)-labeled mouse anti-human CD83 (556855, HB15e, BD Biosciences). Appropriate isotype controls (mouse IgG1 κ or IgG2 α κ , BD Biosciences) were used at the same concentration to determine non-specific staining. Cells were analyzed on an Attune Nxt (Invitrogen) using FlowJo software (version 10; FlowJo LLC, Oregon, USA), and we used a gating strategy to exclude dead cells, based on the FSC/SSC criteria. The data acquisitions were performed on a minimum of 10,000 living cells. Results were expressed as the relative fluorescence intensity (RFI), using the corrected mean fluorescence intensity (cMFI), as follow: $cMFI = MFI - MFI$ of isotype control; $RFI = cMFI$ of treated cells/ $cMFI$ of untreated cells).

Allogeneic co-cultures of moDC and T cells

CD4⁺ T cells were isolated from PBMC by positive selection with mini-MACS separation columns and anti-CD4 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotec). These T cells were confirmed to have purity > 95%, based on CD4 expression evaluated by flow cytometry (561841, RPA-T4, BD Biosciences). CD4⁺ T lymphocytes were labeled with 0.5 mM carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen, Bergisch Gladbach, Germany), following the manufacturer's instructions. MoDC were stimulated with native or aggregated IFX for 24 h, then washed and co-cultured with allogeneic CD4⁺ T cells at a 1:10 DC/T-cell ratio for 5 days, in RPMI 1640 Glutamax supplemented with 10% human serum (Sigma Aldrich, Missouri, USA) in round-bottom 96-well plates. CFSE fluorescence was analyzed using flow cytometry, on an Attune Nxt (Invitrogen) using FlowJo software (version 10; FlowJo LLC). Proliferating T cells corresponded to low CFSE fluorescence.

Cytokines and chemokines quantification in cell culture supernatants

After pretreatment or not with inhibitors, moDC were stimulated for 24 h with native or aggregated IFX. Meso Scale Discovery (MSD, Rockville, MA, USA) multiplex assay was performed on culture supernatants according to the manufacturer's instructions to measure in duplicate IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23p40, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CXCL10 (IP-10), IFN- β , TNF α , CCL17 (TARC) and CCL22 (MDC). The quantification ranges were: IL-1 β : 0.94-3,880 pg.mL⁻¹, IL-6: 0.49-2,040 pg.mL⁻¹, IL-8: 0.56-2,300 pg.mL⁻¹, IL-10: 0.93-3,820 pg.mL⁻¹, IL-12/23p40: 4.85-19,900 pg.mL⁻¹, CCL2: 1.62-6,630 pg.mL⁻¹, CCL3: 1.44-5,920 pg.mL⁻¹, CCL4: 0.53-2,200 pg.mL⁻¹, CCL17 : 0.67-2,760 pg.mL⁻¹, CCL22 : 4.27-17,500 pg.mL⁻¹, CXCL10: 2.20-9,040 pg.mL⁻¹, IFN- β : 24.41-100,000 pg.mL⁻¹, TNF α : 0.92-3,780 pg.mL⁻¹.

Cytokines were measured in moDC/CD4⁺ T-cells co-culture supernatants. IFN γ , IL-5, IL-9, IL-13, IL-17A and IL-22 were quantified in duplicate using MSD multiplex assay following manufacturer's instructions. The quantification ranges were: IFN γ : 21.26-87,100 pg.mL⁻¹, IL-5: 5.07-20,800 pg.mL⁻¹, IL-9: 0.3-1,230 pg.mL⁻¹, IL-10: 4.76-19,500 pg.mL⁻¹, IL-13: 2.40-9,832 pg.mL⁻¹, IL-17A: 29.29-120,000 pg.mL⁻¹ and IL-22: 0.83-3,420 pg.mL⁻¹.

Immunoblot analysis

After pretreatment or not with inhibitors, moDC were incubated for 15, 30 or 60 min with native or aggregated IFX, harvested and washed in cold phosphate buffered saline before lysis in 40 μ L of lysis buffer [20 mM Tris (pH 7.4), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 7.4), 2 mM sodium pyrophosphate, 1% Triton, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM β -glycerophosphate, 10 μ g.mL⁻¹ aprotinin, 10 μ g.mL⁻¹ leupeptin, and 100 μ g.mL⁻¹ pepstatin]. After centrifugation at 15,000 rpm for 20 min at 4°C, 30 μ g of denatured protein were loaded onto 12% SDS-PAGE gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes, which were successively incubated with antibodies directed against the phosphorylated form of Zap-

70 (Tyr319)/Syk (Tyr352) and a HRP-coupled antibody against β -actin as a loading control (Ozyme, St-Quentin en Yvelines, France). Immunoreactive bands were detected by their chemiluminescence by use of the ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France). Bands were quantified with ImageLab software.

Statistical analysis

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

RESULTS

Infliximab aggregates characterization

Aggregates were generated by submitting native IFX at a concentration of 10 mg.mL⁻¹ to a heat stress of 55°C during 24 h. Endotoxin levels were quantified on three independent samples and were always under the acceptable limit of 0.25 EU.mL⁻¹ (data not shown).

Aggregates were first characterized by three complementary methods and on three independent samples. Native and aggregated proteins were first characterized by size exclusion chromatography. A single peak of monomer was observed for native IFX (data not shown). For heat-stressed IFX, a significant decrease in the area of the chromatogram peak of the monomer compared to the native solution was observed. Only 4.7 % of monomeric antibody (0.469 ± 0.086 mg.mL⁻¹) was left in the aggregated solution and no aggregates of intermediate size were detected (data not shown), indicating indirectly that heat stress induced the formation of around 95 % of insoluble aggregates that were not eluted from the column.

Native and aggregate-containing solutions were then analyzed by DLS. The size profiles are reported using volume-weighted analysis (Fig. 1a). At a concentration of 10 mg.mL⁻¹, native IFX gave an asymmetrical distribution centered on 20.4 ± 1.4 nm with a distribution width equal to 6.2 ± 1.1 nm (Supplementary fig. 1). Moreover, the polydispersity index was equal to 0.109. After dilution to 1.0 mg.mL⁻¹, the distribution became symmetrical and centered on 12.4 ± 0.5 nm with a distribution width equal to 2.5 ± 0.6 nm while the polydispersity index decreased to 0.044. There are two possible explanations for this phenomenon. Firstly, a high macromolecule concentration favors reversible self-association. Secondly, the presence of polysorbate 80 in the marketed product could lead to the formation of mixed micelles that are dissociated by simple dilution. The heat-stressed sample resulted in the formation of large particles with a hydrodynamic diameter of 4.1 ± 2.5 μm and a distribution width equal to 0.4 ± 0.2 μm, confirming the formation of aggregates during the heat stress (Fig. 1a). Moreover,

no monomer could be observed by DLS for two reasons: the percentage of monomer in the heat-stressed samples was low (see results above) and the scattering of small particles was masked by the intense scattering of large-sized particles. Furthermore, the large variability observed for both the hydrodynamic diameter and the distribution width could be explained by the presence of large, anisotropic and sedimenting particles in the studied samples.

In order to characterize the aggregates in more detail, flow imaging microscopy was used to analyze the shape and the size of particles present in the aggregated solution. A number-weighted length distribution is illustrated (Fig. 1b). The difference of size range between DLS and flow imaging microscopy was noticeable with an expected shift to larger dimensions, since DLS gives a hydrodynamic diameter equivalent to spherically shaped particle whereas flow imaging microscopy gives the maximum length of the same particle. The heat-stressed sample showed a monomodal population of polydisperse particles and the number-weighted lengths, d_{10} , d_{50} , d_{90} , corresponding to the first, the fifth and the ninth deciles, were 5.4 ± 0.9 , 17.5 ± 1.2 , 52.5 ± 3.5 μm respectively. The relative span reflecting the width of the distribution was rather stable around 2.7 ± 0.2 . Although not monodisperse, the size distribution of the heat-stressed sample was not extensively polydisperse.

Infliximab aggregates induce moDC activation

To investigate IFX aggregates effect on moDC and determine the concentration to be used in the following experiments, we analyzed the expression of surface markers of moDC after 24 hours of stimulation with increasing concentrations of native or aggregated IFX. The toxicity of both native and aggregated antibodies at different concentrations was first analyzed using PI staining and we observed that cell viability was never less than 75% (data not shown). We showed that native IFX had little to no effect on the expression of CD80, CD83, CD86, PD-L1 and CXCR4, whereas IFX aggregates induced a significant concentration-dependent increase of the expression of these surface markers compared to the native antibody, at 50 and

100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 2a). The concentration of 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ did not potentiate the effects observed at 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. These results showed that IFX aggregates induced moDC maturation based on surface markers expression. On the basis of these observations, the following experiments were carried out with the concentration of 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of native or aggregated IFX.

We then measured cytokine and chemokine secretion in moDC culture supernatants in response to 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of native or aggregated IFX. Native IFX did not induce an increase in cytokine and chemokine production compared to untreated cells (Fig. 2b). As for IFX aggregates, little to no IL-1 β , IL-10 and CXCL10 were detected in culture supernatants (data not shown). However, secretion of IFN- β , IL-6, IL-8, IL-12p40, CCL2, CCL3, CCL4, CCL17 and CCL22 was significantly increased in response to aggregates compared to the native protein (Fig. 2b). Interestingly, TNF- α production was not detectable with native IFX but in response to aggregates, it was comparable to the secretion observed with untreated cells (Fig. 2b). Taken together, these results confirmed the potential of IFX aggregates to modulate moDC cytokine and chemokine production thus inducing moDC activation.

Treatment of moDC with infliximab aggregates promotes T-cell proliferation and cytokine production by T cells

To evaluate the functional consequences of moDC maturation and activation by IFX aggregates, we tested the capacity of treated moDC to induce CD4⁺ T-cell proliferation. MoDC treated for 24 h with native or aggregated IFX were co-cultured with allogeneic CD4⁺ T cells loaded with CFSE at a ratio of 1 moDC for 10 CD4⁺ T cells. CD4⁺ T-cell proliferation was assessed on day 5 as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T cells. In a representative experiment, 24.7 % of T cells were CFSE^{low} when incubated with untreated moDC, and native IFX did not alter the capacity of moDC to induce T-cell proliferation compared with unstimulated moDC (Fig. 3a). However, the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T cells was

increased in the presence of moDC stimulated with IFX aggregates compared with moDC stimulated with native IFX as well as untreated moDC (Fig. 3b, a representative experiment is shown in Fig. 3a). These results suggested that IFX aggregates induced a modulation of moDC phenotype capable of promoting allogeneic CD4⁺ T-cell proliferation.

We then analyzed the production of cytokines in the co-culture supernatants. Stimulation of moDC with native IFX did not modulate CD4⁺ T-cell cytokines production compared to untreated moDC effect, whereas moDC stimulated with aggregated IFX induced a significant increase in IL-5, IL-9 and IL-13 production by CD4⁺ T cells compared to untreated moDC and moDC treated with native IFX. IFN γ and IL-22 production was increased compared to moDC treated with native IFX, and IL-10 production was increased in the presence of both native and aggregated IFX (Fig. 3c).

Infliximab aggregates modulate moDC phenotype through Fc γ RIIa interaction

Assuming that Fc γ RIIa could be involved in moDC response to IFX aggregates, cells were pretreated for 1 h with an anti-Fc γ RIIa blocking antibody and then stimulated for 24 h with native or aggregated IFX. The concentration of the antibody was optimized to 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to avoid cellular toxicity (data not shown). An IgG1 isotype control was used in preliminary experiments to ensure that non-specific blocking would not affect moDC response to IFX aggregates (Supplementary fig. 2). We first analyzed the expression of the surface markers CD83, CD86 and CXCR4 by flow cytometry. Results showed that expression of these markers was significantly decreased when moDC were pretreated with the anti-Fc γ RIIa antibody (Fig. 4a).

We next assessed the role of Fc γ RIIa in cytokine and chemokine secretion in culture supernatants. Pretreatment of moDC with the anti-Fc γ RIIa antibody induced a notable decrease in cytokine and chemokine production in response to IFX aggregates (Fig. 4b).

Syk controls moDC phenotype in response to infliximab aggregates

Engagement of Fc γ Rs can involve the activation of the Syk pathway. To evaluate the role of Syk in the response to aggregates, we first assessed its kinetics of phosphorylation using Western blotting. Native IFX induced a slight phosphorylation of Syk compared to untreated moDC basal phosphorylation state. However, IFX aggregates induced a significant increase of Syk phosphorylation compared to native IFX over time, with an early activation starting at 15 min of stimulation (Fig. 5a).

Next, we used a well-described pharmacological inhibitor of Syk, Bay 61-3603, and investigated the role of Syk in moDC activation. Cells were pretreated for 1 h with Bay 61-3603 and then stimulated for 24 h with IFX aggregates. The inhibitor's concentration was optimized to avoid cellular toxicity (data not shown). Results showed that Syk inhibition induced a decrease in moDC surface markers expression (Fig. 5b) as well as cytokine and chemokine secretion (Fig. 5c). Collectively, these results indicated that Syk early activation was essential for moDC maturation in response to IFX aggregates.

Activation of syk in moDC controls T-cell proliferation induced by infliximab aggregates-treated moDC

To investigate the role of Syk in the T-cell response induced by moDC treated with IFX aggregates, we tested the capacity of stimulated moDC pretreated with the inhibitor of Syk to induce CD4⁺ T-cell proliferation. Using allogeneic moDC - CD4⁺ T cells co-culture, we assessed T-cell proliferation on day 5 as the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T cells. Syk inhibition in aggregates-stimulated moDC induced a significant decrease in the percentage of CFSE^{low} CD4⁺ T cells compared with moDC activated with IFX aggregates (Fig. 6b, representative experiment in Fig. 6a).

Finally, we explored the alteration of cytokine production by T cells in response to moDC pretreatment with the Syk inhibitor. By measuring cytokines in co-culture supernatants, we

showed that Syk inhibition in moDC treated with IFX aggregates lead to a significant decrease in CD4⁺ T-cell cytokine production, mainly of IL-5, IL-9 and IL-13 compared to production in CD4⁺ T cells co-cultured with aggregates-treated moDC (Fig. 6c).

DISCUSSION

The correlation between the presence of aggregates and the immunogenicity of therapeutic proteins has been extensively studied over the past years (7, 22, 23). Protein aggregates are suggested to act as danger signals thus favoring DC activation. The aim of our study was to explore the cellular and molecular mechanisms mobilized by antibody aggregates in moDC, able to alter their maturation and consequently CD4⁺ T-cell proliferation. Different signaling pathways could participate to moDC activation in response to aggregates, depending on the surface receptor engaged. In this work, we hypothesized that FcγRIIa, an activating FcR mainly expressed on moDC, is the key receptor interacting with IFX aggregates.

A monoclonal chimeric antibody, IFX, was selected for this study based on its clinical immunogenicity as well as its propensity to aggregate (24, 25). Indeed, we previously showed that IFX is more susceptible to aggregation than other antibodies, making it useful as a model to study aggregates immunogenicity (25). The study of crystal structures has recently shown that IFX has a potential of self-association mediated by the Fab domain (11). Moreover, subjecting IFX to an elevated temperature of 60°C for 2 hours induced protein aggregation mainly due to rapid unfolding of the antibody and increased exposure of hydrophobic sites (26). Understanding protein instability and aggregation in an attempt to enhance stability and to reduce potential immunogenicity of therapeutic proteins, particularly antibodies, is a matter of importance. Indeed, behavior of antibodies, mainly IgG1s, has been studied under different stress conditions, including thermal, mechanical (stirring, shaking, syringe-pumping, freeze-thawing, light exposure) and chemical stress (oxidation, pH shift) using various physicochemical methods (10, 27–30). We used three orthogonal methods to characterize the aggregated solution of IFX generated under heat stress: size exclusion chromatography (SEC), dynamic light scattering (DLS) and micro-flow imaging (MFI). These techniques allowed us to evaluate different parameters including aggregation percentage, shape and size

distribution while covering the entire size-range from a monomeric antibody to subvisible and visible particles (31). Results showed that the applied heat stress induced a loss of 95 % of the monomeric IFX due to the formation of a heterogeneous mixture of insoluble aggregates appearing appear to have an amorphous shape, with the highest percentage of aggregates in the 5 to 15 μm size range. These results are in line with other studies showing that heat stress leads to the formation of a high percentage of aggregates mainly by inducing changes to the conformational structure of the antibody (32, 33). Larger sized particles, of more than 20 μm and up to 200 μm , were also found in our IFX aggregated solution, in accordance with results obtained by submitting monoclonal antibodies to high levels of heat stress (27).

To explore the mechanisms behind aggregates-induced immune response, we first confirmed that submitting IFX to heat stress induced the formation of aggregates that were able to induce maturation of moDC in a concentration-dependent manner. In fact, treatment of moDC with IFX aggregates induced an upregulation of the co-stimulation markers CD86 as well as the activation marker CD83 and the chemokine receptor CXCR4 whereas native IFX did not modulate the expression of these surface markers. These results are in line with other studies showing maturation of human moDC in response to aggregates of therapeutic proteins, such as growth hormone, rituximab and other monoclonal antibodies (9, 10, 25, 30). Here, we also showed that aggregates induced an increased expression of CXCR4 essential for moDC maturation, survival and migration and shown to be upregulated in response to other danger signals such as lipopolysaccharide (LPS) (34, 35). Upon triggering with IFX aggregates, an increased secretion of cytokines mainly IL-6, IL-8, IL-12p40 and IFN- β and chemokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL17 and CCL22 was observed, whereas production of IL-1 β , IL-10 and CXCL10 was not significantly altered. Interestingly, we showed an inhibition of TNF α following treatment with native IFX due its biological activity. In contrast IFX aggregates induced TNF α production comparable to unstimulated cells, which could be explained either

by the loss of IFX biological activity or by the increased activation of moDC by aggregates. Some of the secreted molecules, namely IL-6, CCL2, CCL3 and CCL4 were part of a cytokine signature first identified by Joubert *et al.*, in PBMC triggered by antibody aggregates. Other cytokines, such as IL-1 β , IL-10 and TNF α , were also in this identified signature (12). These data suggested that circulating monocytes could be the main cytokine-producing cell type in PBMC and that differences in the cytokine signature could be due to the type of the applied antibody aggregates.

To confirm that these moDC phenotypic changes induced by aggregates were sufficient to generate or enhance a T-cell response, we performed allogeneic moDC and CD4⁺ T cells co-cultures. We showed that stimulation of moDC with native IFX did not affect T-cell proliferation compared to unstimulated moDC whereas aggregate-stimulated moDC induced a significant increase in T-cell proliferation. Furthermore, an increased production of cytokines was observed, mainly IL-5, IL-13 and IL-9, however IFN- γ and IL-22 production was comparable to unstimulated moDC. Aggregates-induced T-cell response has also been assessed in other studies. In a previous work, we generated protein aggregates under stir stress and showed in an allogeneic co-culture model, that rituximab aggregates induced T-cell proliferation and IFN- γ , IL-5, IL-13 and IL-17A production, whereas human growth hormone aggregates only induced IFN- γ production by proliferating T cells (9). Taken together, these observations suggested that CD4 T-cell response induced by aggregates-stimulated moDC depend on the aggregates-type. In other studies, T-cell response was also studied following PBMC activation by antibody aggregates, where T-cell proliferation was increased as well as the secretion of assessed cytokines IL-2, IL-13, IFN- γ and TNF α (12, 36), confirming that antigen presenting cells were efficiently stimulated by aggregates, so they could induce an adaptive response.

The early mechanisms leading to the observed activation of DC and T cell response are not yet fully described. Alterations in DC phenotype often occur following the recognition of danger signals by pattern recognition receptors such as TLRs. However, engagement of activating Fc γ receptors can also induce DC maturation through activation of different signaling pathways responsible for co-stimulation molecules upregulation, cytokine and chemokine production as well as antigen uptake and presentation (37, 38). As previously mentioned, apart from Fc γ RI which has the highest affinity for monomeric IgGs, other Fc γ R have a higher affinity for immune complexes and aggregated IgGs (16, 39). Monocytes and macrophages express all Fc γ R, neutrophils mainly express Fc γ RIII and DC predominantly express the activating Fc γ RIIa and the inhibitory Fc γ RIIb (18, 39). Interestingly *in vitro* differentiation of monocytes into moDC leads to the loss of Fc γ RI and Fc γ RIII expression (16). In the present work, we used a specific anti-Fc γ RIIa blocking antibody (clone IV.3) to study the involvement of the activating Fc γ RIIa in moDC activation following IFX aggregates treatment (40, 41). We showed for the first time that the engagement of Fc γ RIIa was necessary for moDC maturation. Indeed, neutralization of this receptor induced a decrease in co-stimulation and activation markers expression and in cytokine and chemokine production. Other receptors could be implicated in the binding and recognition of aggregates as danger signals. Joubert *et al.* showed that monoclonal antibody aggregates could induce PBMC activation and cytokine production via other Fc receptors, Fc γ RI and Fc γ RIII, less expressed on moDC and mainly expressed on other innate immune cells like monocytes (12).

Taking into account the implication of Fc γ RIIa in moDC maturation, we hypothesized a downstream a downstream recruitment of Syk that could play an essential role in the internalization of aggregates as well as DC maturation (42). Indeed, we confirmed that IFX aggregates induced an early and increased phosphorylation of Syk compared to native IFX. In fact, we have previously shown that IFX aggregates induced the phosphorylation of Syk and

other signaling pathways such as Akt and ERK, but not JNK and p38 MAPK, in response to IFX aggregates (25). In the present work, we clearly showed the implication of Syk in moDC maturation as we observed a decrease in phenotypic markers expression as well as cytokine and chemokine production following Syk inhibition. Our observation is consistent with a study by Sedlik *et al.* showing that phosphorylation of Syk was required for DC activation after engagement of FcγR by horseradish peroxidase (HRP)-anti HRP immune complexes but not of other surface receptors such as Toll-like receptors (42).

Our results suggest that IFX aggregates cross-link FcγRIIa which in turn induces the recruitment and phosphorylation of Syk that seems to be essential for moDC maturation. More importantly, we showed that inhibition of Syk phosphorylation in moDC lead to a decrease in the T-cell proliferation and cytokine production induced by aggregates. This result distinctly indicates that T cell proliferation is dependent on the activation of moDC by IFX aggregates via the Syk signaling pathway.

Given its high susceptibility to aggregate as well as its immunogenic potential, IFX was used as a model in aggregates immunogenicity to better understand the early events leading to the T-cell response. Antibody aggregates could cross-link activating FcγRIIa expressed on moDC inducing the activation of downstream signaling, starting with the phosphorylation of Syk. Thus, activated signaling cascades would lead to an increased expression of co-stimulatory molecules and secretion of cytokines and chemokines essential for the initiation of a CD4+ T-cell response.

REFERENCES

1. Adegbola, S. O., K. Sahnan, J. Warusavitarne, A. Hart, and P. Tozer. 2018. Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci* 19.
2. Monaco, C., J. Nanchahal, P. Taylor, and M. Feldmann. 2015. Anti-TNF therapy: past, present and future. *Int Immunol* 27: 55–62.
3. Wong, U., and R. K. Cross. 2017. Primary and secondary nonresponse to infliximab: mechanisms and countermeasures. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 13: 1039–1046.
4. Moots, R. J., R. M. Xavier, C. C. Mok, M. U. Rahman, W.-C. Tsai, M. H. Al-Maini, K. Pavelka, E. Mahgoub, S. Kotak, J. Korth-Bradley, R. Pedersen, L. Mele, Q. Shen, and B. Vlahos. 2017. The impact of anti-drug antibodies on drug concentrations and clinical outcomes in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: Results from a multinational, real-world clinical practice, non-interventional study. *PLoS One* 12.
5. Ungar, B., Y. Chowers, M. Yavzori, O. Picard, E. Fudim, O. Har-Noy, U. Kopylov, R. Eliakim, S. Ben-Horin, and ABIRISK consortium. 2014. The temporal evolution of antidrug antibodies in patients with inflammatory bowel disease treated with infliximab. *Gut* 63: 1258–1264.
6. Van Stappen, T., N. Vande Casteele, G. Van Assche, M. Ferrante, S. Vermeire, and A. Gils. 2018. Clinical relevance of detecting anti-infliximab antibodies with a drug-tolerant assay: post hoc analysis of the TAXIT trial. *Gut* 67: 818–826.
7. Moussa, E. M., J. P. Panchal, B. S. Moorthy, J. S. Blum, M. K. Joubert, L. O. Narhi, and E. M. Topp. 2016. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J Pharm Sci* 105: 417–430.
8. Haji Abdolvahab, M., A. Fazeli, A. Halim, A. S. Sediq, M. R. Fazeli, and H. Schellekens. 2016. Immunogenicity of Recombinant Human Interferon Beta-1b in Immune-Tolerant Transgenic Mice Corresponds with the Biophysical Characteristics of Aggregates. *J Interferon & Cytokine Res* 36: 247–257.
9. Gallais, Y., N. Szely, F.-X. Legrand, A. Leroy, M. Pallardy, and I. Turbica. 2017. Effect of growth hormone and IgG aggregates on dendritic cells activation and T-cells polarization. *Immunol. Cell Biol.* 95: 306–315.
10. Ahmadi, M., C. J. Bryson, E. A. Cloake, K. Welch, V. Filipe, S. Romeijn, A. Hawe, W. Jiskoot, M. P. Baker, and M. H. Fogg. 2015. Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics. *Pharm. Res.* 32: 1383–1394.
11. Lerch, T. F., P. Sharpe, S. J. Mayclin, T. E. Edwards, E. Lee, H. D. Conlon, S. Polleck, J. C. Rouse, Y. Luo, and Q. Zou. 2017. Infliximab crystal structures reveal insights into self-association. *MAbs* 9: 874–883.
12. Joubert, M. K., M. Hokom, C. Eakin, L. Zhou, M. Deshpande, M. P. Baker, T. J. Goletz, B. A. Kerwin, N. Chirmule, L. O. Narhi, and V. Jawa. 2012. Highly Aggregated Antibody

- Therapeutics Can Enhance the in Vitro Innate and Late-stage T-cell Immune Responses. *J. Biol. Chem.* 287: 25266–25279.
13. Nabhan, M., Y. Gallais, M. Pallardy, and I. Turbica. 2019. Growth hormone aggregates activation of human dendritic cells is controlled by Rac1 and PI3 kinase signaling pathways. *J Pharm Sci*
14. Bruhns, P., B. Iannascoli, P. England, D. A. Mancardi, N. Fernandez, S. Jorieux, and M. Daëron. 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113: 3716–3725.
15. Pincetic, A., S. Bournazos, D. J. DiLillo, J. Maamary, T. T. Wang, R. Dahan, B.-M. Fiebiger, and J. V. Ravetch. 2014. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 15: 707–716.
16. Boruchov, A. M., G. Heller, M.-C. Veri, E. Bonvini, J. V. Ravetch, and J. W. Young. 2005. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* 115: 2914–2923.
17. Piemonti, L., P. Monti, M. Sironi, P. Fraticelli, B. E. Leone, E. Dal Cin, P. Allavena, and V. Di Carlo. 2000. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 164: 4443–4451.
18. Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2008. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 34–47.
19. Kiener, P. A., B. M. Rankin, A. L. Burkhardt, G. L. Schieven, L. K. Gilliland, R. B. Rowley, J. B. Bolen, and J. A. Ledbetter. 1993. Cross-linking of Fc gamma receptor I (Fc gamma RI) and receptor II (Fc gamma RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 268: 24442–24448.
20. Mócsai, A., J. Ruland, and V. L. J. Tybulewicz. 2010. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 10: 387–402.
21. Telikepalli, S., H. E. Shinogle, P. S. Thapa, J. H. Kim, M. Deshpande, V. Jawa, C. R. Middaugh, L. O. Narhi, M. K. Joubert, and D. B. Volkin. 2015. Physical Characterization and In Vitro Biological Impact of Highly Aggregated Antibodies Separated into Size-Enriched Populations by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *J Pharm Sci* 104: 1575–1591.
22. Dingman, R., and S. V. Balu-Iyer. 2019. Immunogenicity of Protein Pharmaceuticals. *J. PharmSci* 108: 1637–1654.
23. Boehncke, W.-H., and N. C. Brembilla. 2018. Immunogenicity of biologic therapies: causes and consequences. *Expert Rev Clin Immunol* 14: 513–523.
24. Quistrebert, J., S. Hässler, D. Bachelet, C. Mbogning, A. Musters, P. P. Tak, C. A. Wijbrandts, M. Herenius, S. A. Bergstra, G. Akdemir, M. Johannesson, B. Combe, B. Fautrel, S. Chollet-Martin, A. Gleizes, N. Donnellan, F. Deisenhammer, J. Davidson, A. Hincelin-Mery, P. Dönnès, A. Fogdell-Hahn, N. De Vries, T. Huizinga, I. Abugessaisa, S. Saevarsdottir, S. Hacein-Bey-Abina, M. Pallardy, P. Broët, X. Mariette, and ABIRISK Consortium. 2018. Incidence and risk factors for adalimumab and infliximab anti-drug

antibodies in rheumatoid arthritis: A European retrospective multicohort analysis. *Semin. Arthritis Rheum.*

25. Morgan, H., S.-Y. Tseng, Y. Gallais, M. Leineweber, P. Buchmann, S. Riccardi, M. Nabhan, J. Lo, Z. Gani, N. Szely, C. S. Zhu, M. Yang, A. Kiessling, H.-W. Vohr, M. Pallardy, F. Aswad, and I. Turbica. 2019. Evaluation of in vitro Assays to Assess the Modulation of Dendritic Cells Functions by Therapeutic Antibodies and Aggregates. *Front. Immunol.* 10.
26. Pisupati, K., A. Benet, Y. Tian, S. Okbazghi, J. Kang, M. Ford, S. Saveliev, K. I. Sen, E. Carlson, T. J. Tolbert, B. T. Ruotolo, S. P. Schwendeman, and A. Schwendeman. 2017. Biosimilarity under stress: A forced degradation study of Remicade® and Remsima™. *MAbs* 9: 1197–1209.
27. Joubert, M. K., Q. Luo, Y. Nashed-Samuel, J. Wypych, and L. O. Narhi. 2011. Classification and Characterization of Therapeutic Antibody Aggregates. *J. Biol. Chem.* 286: 25118–25133.
28. Luo, Q., M. K. Joubert, R. Stevenson, R. R. Ketchem, L. O. Narhi, and J. Wypych. 2011. Chemical Modifications in Therapeutic Protein Aggregates Generated under Different Stress Conditions. *J. Biol. Chem.* 286: 25134–25144.
29. Filipe, V., W. Jiskoot, A. H. Basmeh, A. Halim, H. Schellekens, and V. Brinks. 2012. Immunogenicity of different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice. *MAbs* 4: 740–752.
30. Rombach-Riegraf, V., A. C. Karle, B. Wolf, L. Sordé, S. Koepke, S. Gottlieb, J. Krieg, M.-C. Djidja, A. Baban, S. Spindeldreher, A. V. Koulov, and A. Kiessling. 2014. Aggregation of Human Recombinant Monoclonal Antibodies Influences the Capacity of Dendritic Cells to Stimulate Adaptive T-Cell Responses In Vitro. *PLoS ONE* 9: e86322.
31. Mahler, H.-C., W. Friess, U. Grauschopf, and S. Kiese. 2009. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci* 98: 2909–2934.
32. Hawe, A., J. C. Kasper, W. Friess, and W. Jiskoot. 2009. Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *Eur J Pharm Sci* 38: 79–87.
33. Telikepalli, S. N., O. S. Kumru, C. Kalonia, R. Esfandiary, S. B. Joshi, C. R. Middaugh, and D. B. Volkin. 2014. Structural Characterization of IgG1 mAb Aggregates and Particles Generated under Various Stress Conditions. *J Pharm Sci* 103: 796–809.
34. Gouwy, M., S. Struyf, L. Leutenez, N. Pörtner, S. Sozzani, and J. Van Damme. 2014. Chemokines and other GPCR ligands synergize in receptor-mediated migration of monocyte-derived immature and mature dendritic cells. *Immunobiology* 219: 218–229.
35. Kabashima, K., K. Sugita, N. Shiraishi, H. Tamamura, N. Fujii, and Y. Tokura. 2007. CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361: 1012–1016.
36. Joubert, M. K., M. Deshpande, J. Yang, H. Reynolds, C. Bryson, M. Fogg, M. P. Baker, J. Herskovitz, T. J. Goletz, L. Zhou, M. Moxness, G. C. Flynn, L. O. Narhi, and V. Jawa. 2016.

Use of In Vitro Assays to Assess Immunogenicity Risk of Antibody-Based Biotherapeutics. *PLoS One* 11.

37. Guilleams, M., P. Bruhns, Y. Saeys, H. Hammad, and B. N. Lambrecht. 2014. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 94–108.
38. Rosales, C., and E. Uribe-Querol. 2017. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Res Int.*
39. Bournazos, S., T. T. Wang, and J. V. Ravetch. 2016. The Role and Function of Fc γ Receptors on Myeloid Cells. *Microbiol Spectr* 4.
40. Ramsland, P. A., W. Farrugia, T. M. Bradford, C. Tan Sardjono, S. Esparon, H. M. Trist, M. S. Powell, P. Sze Tan, A. C. Cendron, B. D. Wines, A. M. Scott, and P. M. Hogarth. 2011. Structural Basis for Fc γ RIIa Recognition of Human IgG and Formation of Inflammatory Signaling Complexes. *J Immunol* 187: 3208–3217.
41. Veri, M.-C., S. Gorlatov, H. Li, S. Burke, S. Johnson, J. Stavenhagen, K. E. Stein, E. Bonvini, and S. Koenig. 2007. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fc γ -receptor IIB (CD32B) from the activating Fc γ -receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* 121: 392–404.
42. Sedlik, C., D. Orbach, P. Veron, E. Schweighoffer, F. Colucci, R. Gamberale, A. Ioan-Facsinay, S. Verbeek, P. Ricciardi-Castagnoli, C. Bonnerot, V. L. J. Tybulewicz, J. D. Santo, and S. Amigorena. 2003. A Critical Role for Syk Protein Tyrosine Kinase in Fc Receptor-Mediated Antigen Presentation and Induction of Dendritic Cell Maturation. *J Immunol* 170: 846–852.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Infliximab aggregates characterization.

Native (1.0 mg.mL⁻¹) and heat-stressed infliximab (10 mg.mL⁻¹) were characterized by physico-chemical methods: (a) Representative images of infliximab aggregates detected using an optical microscope (×40 objective); (b) Volume-weighted profile for the evaluation of size distribution of infliximab in its native or aggregated form was obtained by Dynamic Light Scattering; (c) Particle size distribution : histogram represents the number of particles per size range, with the lower limit of quantitation of the instrument set to 1 μm and the upper limit being the size of the 400 μm-chosen cell with a minimal luminance set at 10 %; the curve represents the cumulative frequency of particles.

Figure 2: Infliximab aggregates trigger moDC activation.

(a) Infliximab aggregates induce a dose-dependent modulation of the moDC phenotype.

Immature moDC were treated for 24 h with native (IFX n) or aggregated (IFX hs) infliximab (25 to 200 μg.mL⁻¹). Cells were then collected, washed and analyzed by flow cytometry for surface markers expression. Results are expressed as relative fluorescence intensity (RFI) compared to non-stimulated cells and represented the mean ± SEM of 5 or 6 independent experiments. *: p<0.05 Wilcoxon signed-rank test. NS: non-stimulated cells.

(b) Infliximab aggregates induce secretion of cytokines and chemokines in moDC.

Immature moDC were treated for 24 h with native (IFX n) or aggregated (IFX hs) infliximab (100 μg.mL⁻¹). Cytokine and chemokine concentrations in culture supernatants were analyzed in duplicate using an electroluminescent multiplex assay. Detection limits are indicated in the Methods section. Results of 6 independent experiments are represented as dot plot, *: p<0.05 Wilcoxon signed-rank test. NS: non-stimulated cells.

Figure 3: Treatment of moDC with infliximab aggregates promotes T-cell proliferation and cytokine production.

(a,b) T-cell proliferation. After purification, T cells were labeled with CFSE and incubated with moDC previously stimulated with native (IFX n) or aggregated (IFX hs) infliximab ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), at a ratio of 1:10 (T-cell:DC). Co-cultures were then incubated for 5 days, and proliferation was analyzed by flow cytometry. (a) Results are presented as histograms of one representative experiment of six, % represents the CFSE^{low} cells. (b) Percentage of CFSE^{low} T cells in response to stimulated moDC with native or aggregated infliximab. (c) On day 5, cytokine levels were quantified in co-culture supernatants in duplicate, using an electroluminescent multiplex assay. Detection limits are indicated in the Methods section. Results for lymphocyte proliferation and cytokine production are expressed as the mean \pm SEM of 6 independent experiments, *:p<0.05 Wilcoxon signed-rank test. NS: non-stimulated cells.

Figure 4: Fc γ RIIa controls the regulation of moDC phenotype altered by infliximab aggregates.

Immature moDC were pretreated for 1 h with anti-Fc γ RIIa antibody ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and then treated for 24 h with aggregated (IFX hs) infliximab ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). (a) Cells were collected, washed and analyzed by flow cytometry for surface markers expression. Results are expressed as relative fluorescence intensity (RFI) compared to non-stimulated cells and represented the mean \pm SEM of 6 independent experiments. (b) Cytokine and chemokine concentrations in culture supernatants were analyzed in duplicate using an electroluminescent multiplex assay. Detection limits are indicated in the Methods section. Results of 6 independent experiments are represented as dot plot, *: p<0.05 Wilcoxon signed-rank test.

Figure 5: Syk controls moDC activation in response to infliximab aggregates.

(a) Immature moDC were treated for 15, 30 and 60 mn with native (IFX n) or aggregated (IFX hs) infliximab ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Immunoblotting of whole-cell extracts was used to quantify the phosphorylated form of Syk. The results of 3 independent experiments are represented. Bands were quantified using the Image Lab software. Results are expressed as the fold induction, representing the ratio of the normalized intensity of specific bands of treated cells divided by the normalized intensity of untreated cells, *: $p < 0.05$ Mann-Whitney *U*-test.

(b-c) Immature moDC were pretreated for 1 h with Syk inhibitor IV ($1 \mu\text{M}$) then treated for 24 h with aggregated infliximab (IFX hs) ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). (b) Cells were collected, washed and analyzed by flow cytometry for surface markers expression. Results are expressed as fold increase compared to non-stimulated cells and represented as the mean \pm SEM of 6 independent experiments. (c) Cytokine and chemokine concentrations in culture supernatants were analyzed in duplicate using an electrochemiluminescent multiplex assay. Detection limits are indicated in the Methods section. Results of 6 independent experiments are represented as dot plot, *: $p < 0.05$ Wilcoxon signed-rank test.

Figure 6: Syk signaling pathway in moDC regulates T-cell proliferation induced by infliximab aggregates-treated moDC.

(a,b) T-cell proliferation. After purification, T cells were labeled with CFSE and incubated with moDC previously pretreated or not with Syk inhibitor and then stimulated with native (IFX n) or aggregated infliximab (IFX hs) ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), at a ratio of 1:10 (T-cell:DC). Co-cultures were then incubated for 5 days, and proliferation was analyzed by flow cytometry. (a) Results are presented as histograms of one representative experiment of six, % represents the CFSE^{low} cells. (b) Percentage of CFSE^{low} T cells in response to stimulated moDC with

aggregated infliximab, pretreated or not with Syk inhibitor. (c) On day 5, cytokine levels were quantified in co-culture supernatants in duplicate, using an electrochemiluminescent multiplex assay. Detection limits are indicated in the Methods section. Results of 6 independent experiments are represented, *: $p < 0.05$ Wilcoxon signed-rank test.

Figure 1

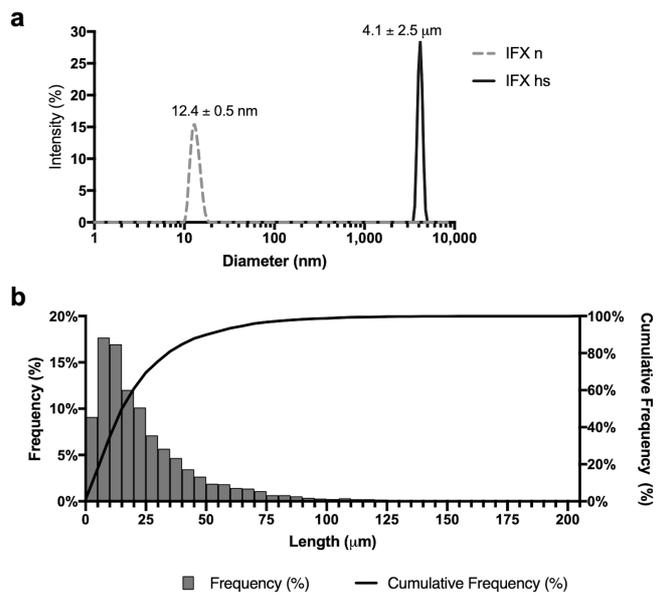


Figure 2

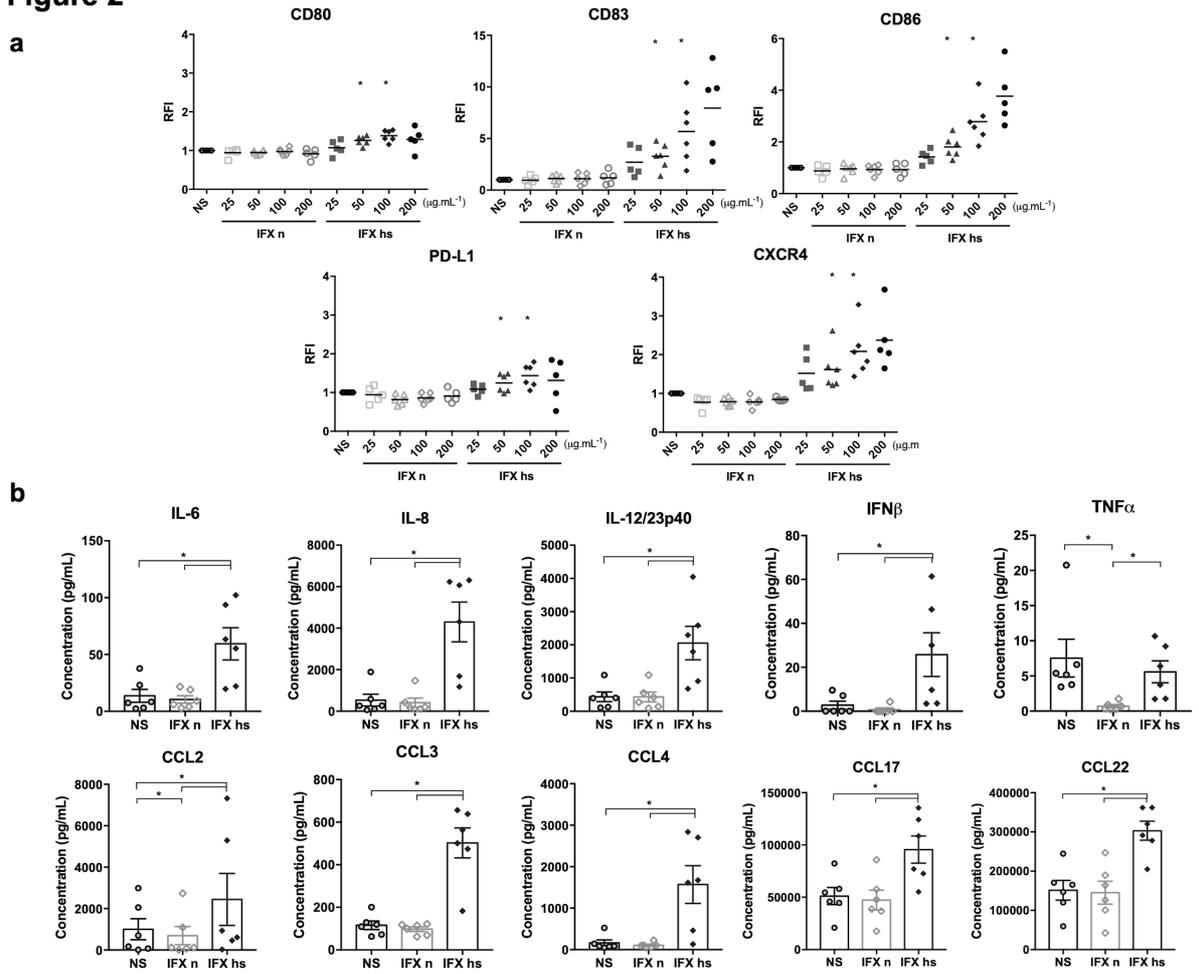


Figure 3

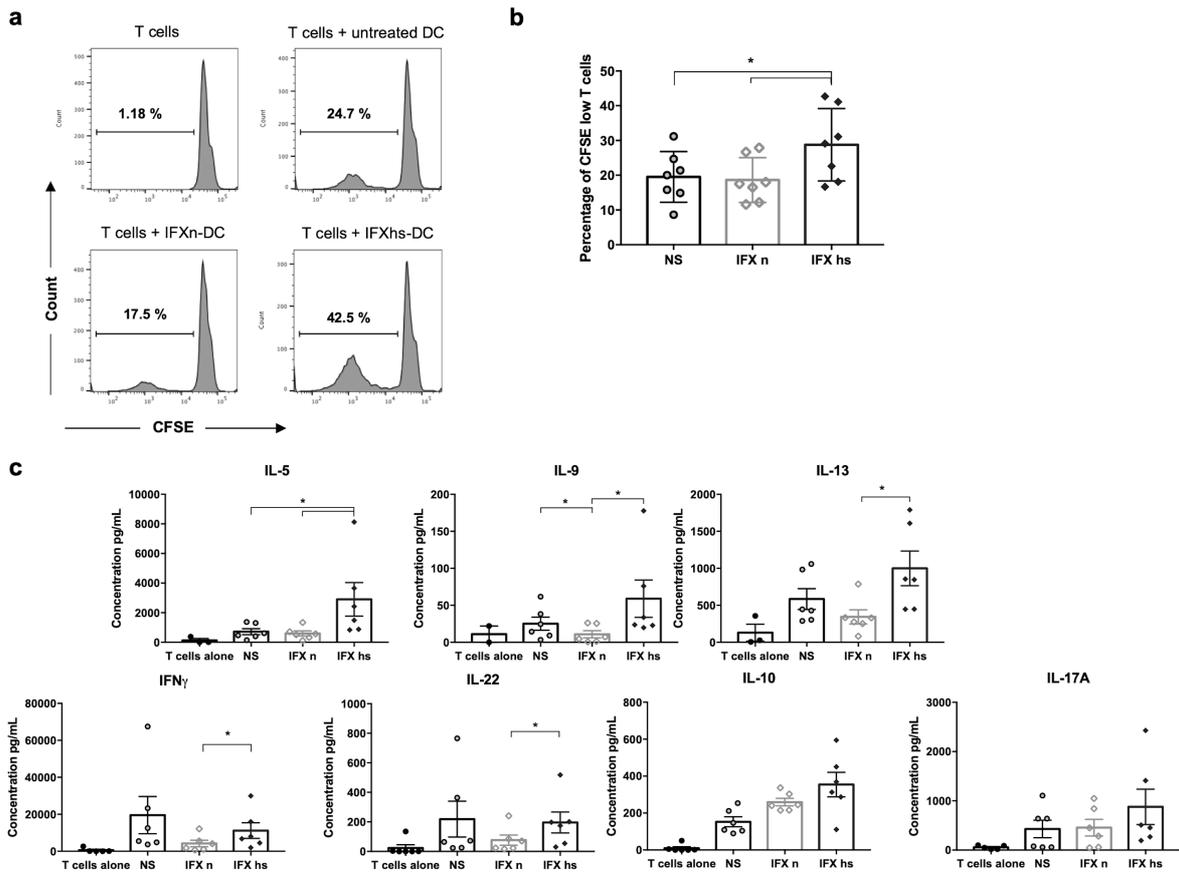
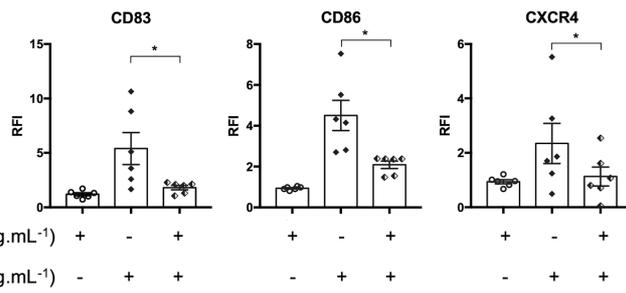


Figure 4

a



b

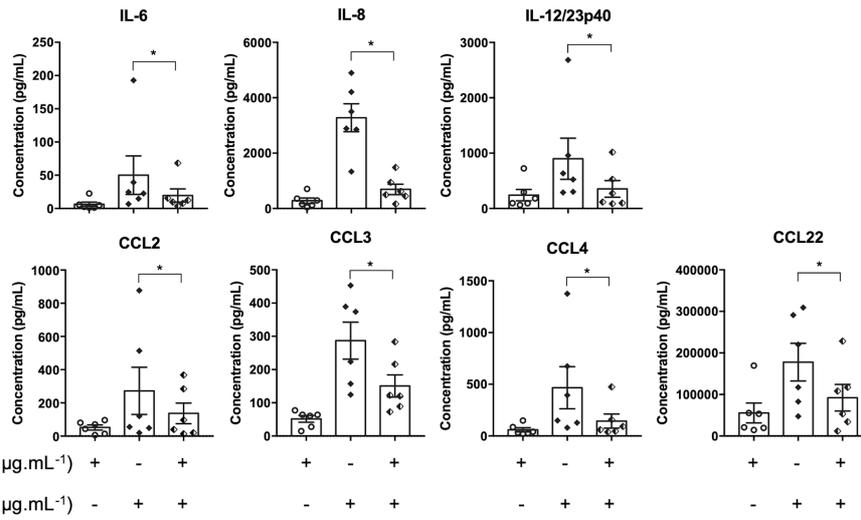


Figure 5

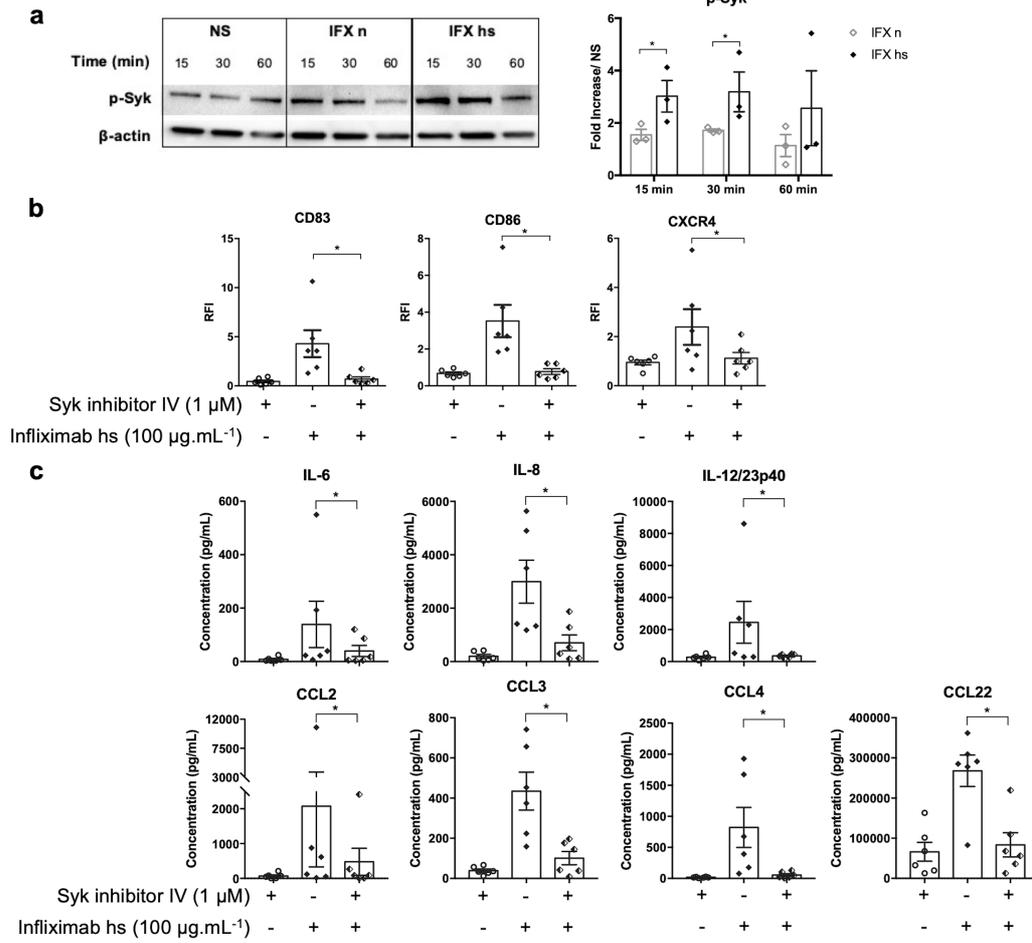
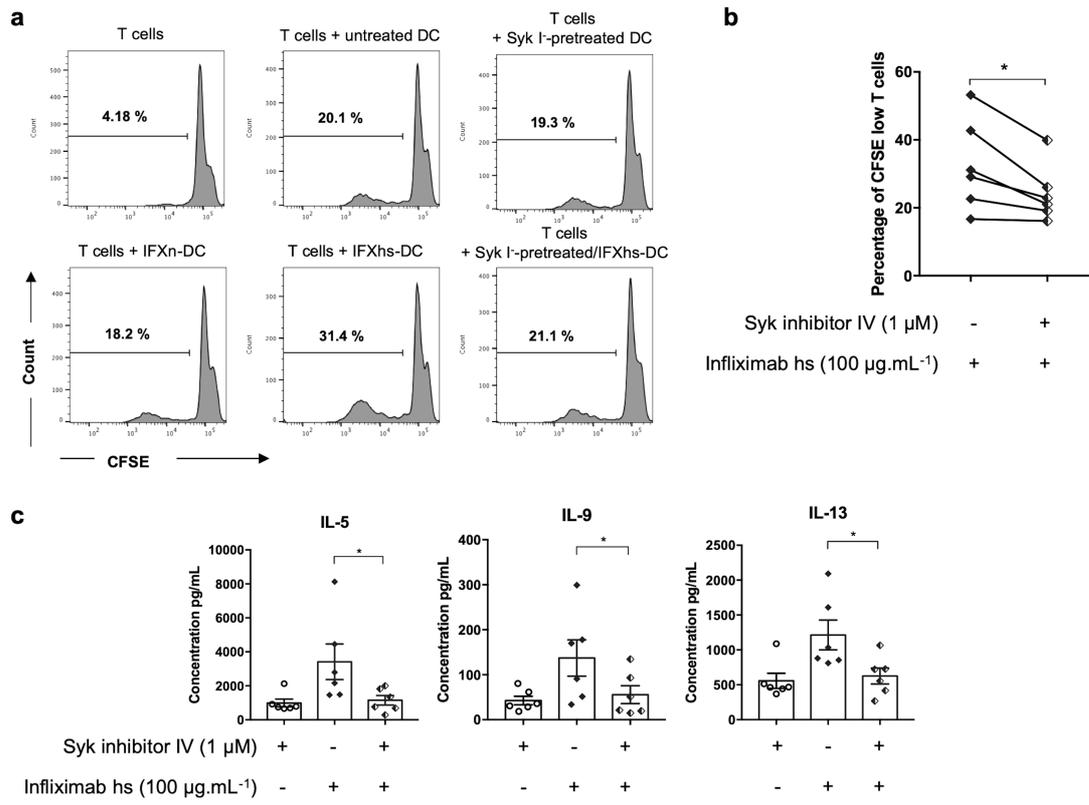
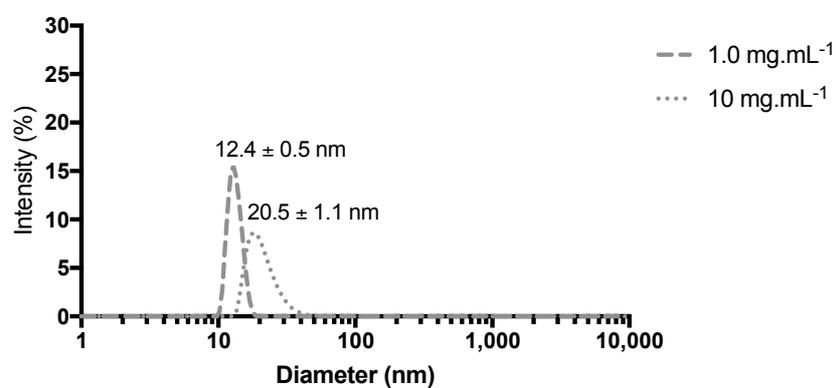


Figure 6

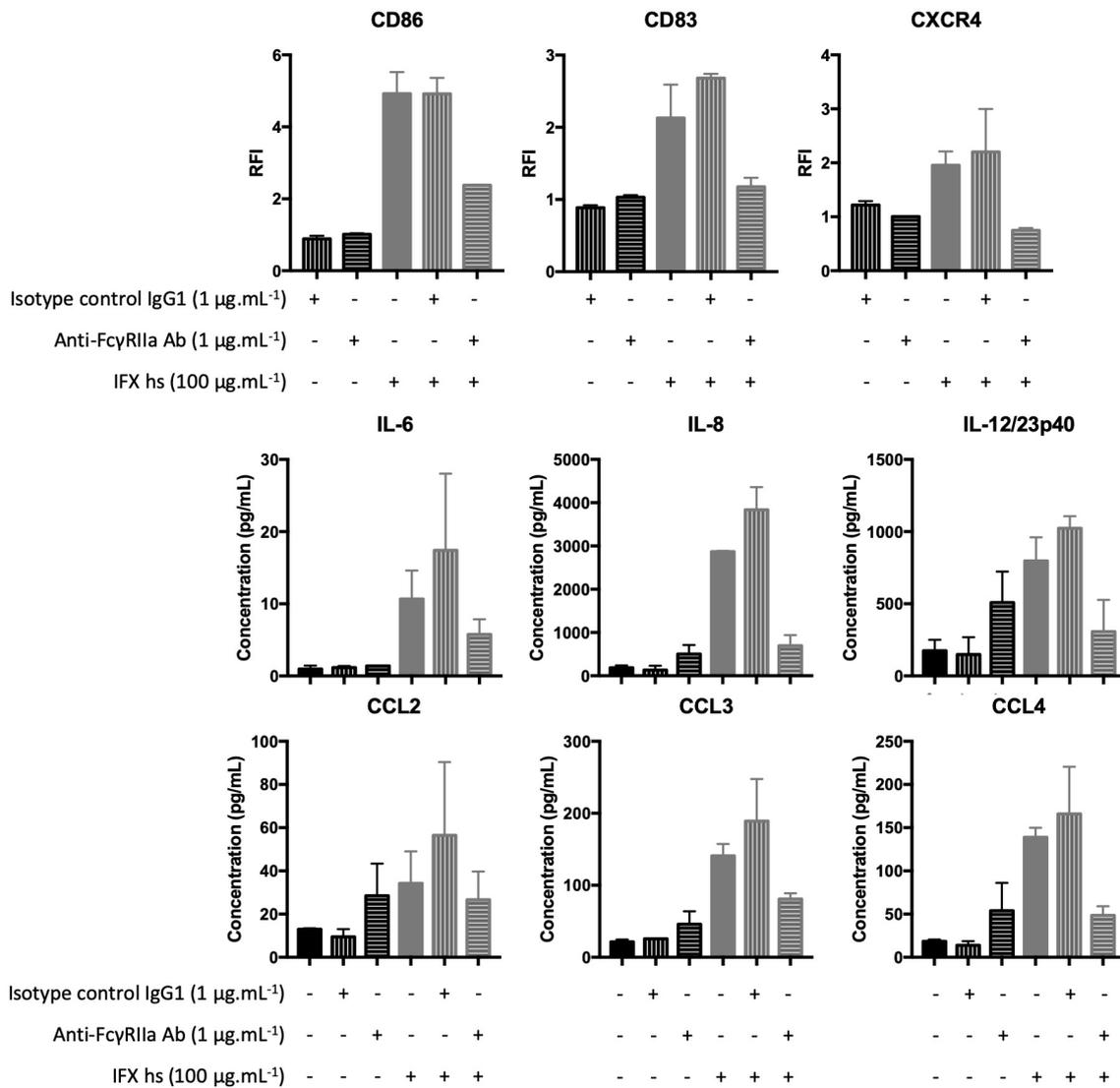


Supplementary fig. 1: Native infliximab characterization.



Volume-weighted profile for the evaluation of size distribution of infliximab in its native form was obtained by Dynamic Light Scattering at two concentrations (1 and 10 mg.mL⁻¹).

Supplementary fig. 2: Effect of FcγRIIIa and isotype control antibodies on moDC activation.



Immature moDC were pretreated for 1 h with anti-Fc γ RIIIa or isotype control antibodies (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and then treated for 24 h with aggregated (IFX hs) infliximab (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). (a) Cells were collected, washed and analyzed by flow cytometry for surface markers expression. Results are expressed as relative fluorescence intensity (RFI) compared to non-stimulated cells and represented the mean \pm SEM of 2 independent experiments. (b) Cytokine and chemokine concentrations in culture supernatants were analyzed in duplicate using an electroluminescent multiplex assay. Detection limits are indicated in the Methods section. Results are represented as the mean \pm SEM of 2 independent experiments.

**Partie II : Étude du répertoire de lymphocytes T CD4⁺ naïfs
reconnaissant les agrégats d'anticorps**

Résultats complémentaires

Étude du répertoire de lymphocytes T CD4⁺ naïfs reconnaissant les agrégats d'anticorps

1. Introduction

Il est actuellement admis que les agrégats protéiques sont impliqués dans l'induction de l'immunogénicité des biomédicaments de par leur rôle de signaux de danger. Cependant, la possibilité qu'une protéine agrégée génèrent de nouvelles entités antigéniques n'a été que peu étudiée. Les données de la littérature indiquent qu'il existe, chez des donneurs sains, un répertoire préexistant de LT CD4⁺ reconnaissant des biomédicaments tels que l'infliximab, le rituximab et l'adalimumab (Delluc et al., 2011; Schultz et al., 2017). Des études complémentaires sur des cellules de patients traités et des donneurs sains ont également permis l'identification d'épitopes T spécifiques, au niveau des fragments variables des anticorps, qui favoriseraient leur immunogénicité. Ceci a notamment été décrit dans le cas du rituximab, de l'infliximab (Hamze et al., 2017; Pratesi et al., 2019) et du natalizumab (Cassotta et al., 2019). Par ailleurs, dans le cas des agrégats d'anticorps thérapeutiques, il a été montré que ces agrégats pouvaient être internalisés par des DC dérivées de monocytes (moDC) et être co-localisés avec les molécules HLA-DR, dès 30 min d'incubation, favorisant ainsi leur présentation (Ahmadi et al., 2015). De plus, une étude utilisant la technique du MAPPs a permis de déterminer les séquences peptidiques présentées sur les molécules du CMH de classe II de moDC incubées avec des agrégats d'anticorps. Cette étude a montré qu'une forte agrégation d'anticorps monoclonaux IgG pouvait induire une augmentation de la quantité et de la diversité des peptides présentés par les molécules du CMH II. Ceci suggère que l'agrégation peut induire des modifications dans les mécanismes de digestion des protéines, d'association des peptides aux molécules du CMH II et de présentation aux LT (Rombach-Riegraf et al., 2014).

L'objectif de notre étude est de mieux comprendre le mécanisme de l'immunisation contre les agrégats d'anticorps, plus précisément le rôle des LT dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative, et ceci à travers l'exploration de l'effet antigénique potentiel des agrégats d'anticorps. La présence d'agrégats dans les préparations pourrait induire des modifications au niveau des peptides présentés aux LT et potentiellement favoriser l'activation spécifique de ces cellules. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la fréquence de LT CD4⁺ reconnaissant les agrégats d'anticorps serait augmentée par rapport à celle déterminée pour les LT spécifiques de l'anticorps natif.

En raison de son immunogénicité et de sa susceptibilité à l'agrégation, nous avons choisi l'inflximab (IFX) comme modèle pour produire des agrégats. Nous avons précédemment montré que des agrégats d'inflximab (IFX), formés à température élevée, pouvaient induire la maturation des moDC et augmenter la prolifération des LT dans un modèle allogénique. Dans ce travail, nous avons testé différents types de stress, lumière ultraviolette (UV) ou température élevée (*heat stress* ou HS) de durées variables, pour produire des agrégats que nous avons caractérisés, en définissant précisément leurs tailles. Les résultats de cette caractérisation ont montré que le stress UV induisait la formation de dimères et d'oligomères solubles alors que le stress HS induisait la formation d'agrégats dont la proportion augmentait avec la durée du stress et avec une fraction majoritaire (près de 75 %) des particules de taille variant entre 1 et 10 µm quelle que soit la durée du stress.

Nous avons donc posé deux questions : Quelle est la proportion d'agrégats micrométriques nécessaire pour un effet adjuvant et/ou une influence sur la réponse des LT ? Les agrégats solubles participent-ils à une augmentation de la réponse T autologue ?

Dans un premier temps, nous avons montré que les agrégats d'IFX HS induisaient la maturation des moDC en fonction de la quantité d'agrégats présents dans l'échantillon.

Puis, en utilisant un modèle de co-cultures de moDC et de LT CD4⁺ naïfs autologues, nous montrons que la fréquence de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX agrégé (UV et HS1) était augmentée par rapport à celle des LT reconnaissant l'IFX natif. L'étude de la réactivité croisée des LT spécifiques nous a également permis de montrer que des LT peuvent reconnaître à la fois l'anticorps natif et agrégé, alors que d'autres LT seraient uniquement spécifiques par des peptides provenant de la forme agrégée.

2. Partie 1 : Cas des agrégats de taille micrométrique

2.1. Matériel et Méthodes

Production des agrégats

L'infliximab lyophilisé (Remicade[®], IFX), disponible sur le marché, a été reconstitué à une concentration de 10 mg.mL⁻¹ avec de l'eau stérile. Pour induire la formation d'agrégats, les échantillons ont été dilués à 1 mg.mL⁻¹ avec de l'eau stérile et soumis à un stress thermique (HS) à 55°C pendant 1, 2, 3, 4, 6 et 24 heures. Les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à leur emploi. La stabilité des agrégats a été vérifiée par des mesures de taille utilisant la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et l'imagerie de flux par microscopie (MFI) avant et après congélation et aucune modification n'a été observée.

Caractérisation des agrégats

La caractérisation a été réalisée à l'aide de méthodes précédemment décrites (SEC et MFI). L'analyse par SEC des agrégats HS a permis de calculer par différence le pourcentage d'agrégats insolubles formés à partir du pourcentage de monomères restants après agrégation. Pour l'analyse par MFI, des échantillons à 1 mg.mL⁻¹ ont été dilués dans de l'eau stérile à 0,5 mg.mL⁻¹ et injectés dans une cellule de mesure avec un écartement entre les plaques de 100 µm et un grossissement x6.

Modèle cellulaire : cellules dendritiques dérivées de monocytes humains

Les cellules dendritiques (moDC) sont différenciées à partir de monocytes isolés du sang de donneurs sains. Comme précédemment décrit, la purification des monocytes est effectuée à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) par sélection positive à l'aide d'anticorps anti-CD14 couplés à des billes magnétiques (Miltenyi Biotec, Allemagne). Les monocytes sont ensuite mis en culture, pendant 4 jours, à raison de 10^6 cellules/ml en présence de GM-CSF (550 U/ml) et d'IL-4 (550 U/ml) (Miltenyi Biotec) en milieu RPMI 1640 + GlutaMAX™ (Gibco, ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 1 mM sodium pyruvate et antibiotiques, à 37°C sous atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂. La différenciation des moDC et leur caractère immature sont vérifiés par cytométrie en flux à J4 en quantifiant l'expression des marqueurs de surface CD1a, DC-SIGN, CD83 et CD86.

Traitement des moDC par l'infliximab natif ou agrégé

Les moDC sont traitées par l'infliximab natif (IFX N) ou agrégé (HS1, HS2, HS3, HS4, HS6, HS24) à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou par le lipopolysaccharide (LPS) à 25 ng.mL^{-1} pendant 30 minutes, 1, 2 ou 24 heures selon les expériences.

Analyse de la maturation des moDC par cytométrie en flux

Après 24 heures de traitement avec l'IFX natif ou agrégé, la viabilité et le phénotype des cellules sont évalués par cytométrie en flux. La mortalité cellulaire a été évaluée lors d'expériences préliminaires par un marquage des moDC à l'iodure de propidium et n'excédait pas 25 % aux concentrations testées. Le phénotype est analysé suite à un marquage cellulaire avec les anticorps (PD-L1^{FITC} (558065), CD83^{PE} (556855), CD86^{APC} (555660); BD Biosciences, New Jersey, USA) et les contrôles isotypiques (IgG1 κ murine, BD Biosciences) appropriés pendant 20 minutes à 4°C, comme précédemment décrits (article 1). L'analyse phénotypique est réalisée par cytométrie en flux (Attune NXT, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) à l'aide du

logiciel FlowJo (version 10; FlowJo LLC, Oregon, USA). Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence relative (RFI) calculée à partir de l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) corrigée par la fluorescence des contrôles isotypiques, selon la formule suivante :

$$RFI = \frac{MFI_{cellules\ traitées} - MFI\ (contrôle\ isotypique)_{cellules\ traitées}}{MFI_{cellules\ non\ traitées} - MFI\ (contrôle\ isotypique)_{cellules\ non\ traitées}}$$

Marquage des agrégats

Les agrégats d'IFX produits sous 55°C pendant 1 heure (HS1) ou 24 heures (HS24) ont été marqués à l'Alexa Fluor 488 (A37570, ThermoFisher Scientific). Après ajout des agrégats (1 mg.mL⁻¹) au lyophilisat d'Alexa Fluor (AF), la suspension obtenue a été agitée pendant 1 heure à 200 rpm à température ambiante. Les agrégats marqués ont ensuite été débarrassés de l'excédent de fluorophore par dialyse en cassette (Slide-A-Lyzer® 10K, ThermoFisher Scientific). Les aliquots d'agrégats marqués ont été conservés à -20°C.

Étude de l'internalisation des agrégats d'infliximab

Les moDC ont été traitées avec 100 µg.mL⁻¹ d'agrégats IFX marqués (HS1 ou HS24), pendant 30, 60 et 120 minutes à 37°C ou sur glace (comme contrôle). Après incubation, les cellules ont été lavées 3 fois au tampon phosphate salin (PBS) et leur internalisation a été analysée par cytométrie en flux (Attune Nxt, ThermoFisher Scientific) à l'aide du logiciel FlowJo (version 10; FlowJo LLC).

Co-culture autologue de cellules dendritiques et lymphocytes T

Les cellules ont été isolées du sang de donneurs sains. Les DC ont été différenciées à partir de monocytes, comme précédemment décrit, et les LT CD4⁺ naïfs autologues ont été isolés par purification magnétique (Miltenyi Biotec, Allemagne). La pureté du tri CD4⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺ évaluée par cytométrie était supérieure à 90 % ; les anticorps suivants ont été utilisés : CD4^{APC} (clone RPA-T4, 555349 ; BD Biosciences), CD45RA^{FITC} (clone REA562, 130-113-927 ; Miltenyi Biotec) et CCR7^{FITC} (clone REA546, 130-120-608 ; Miltenyi Biotec).

Les moDC ont été maturées en présence du LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Sigma Aldrich) et chargées pendant la nuit avec l'inflximab natif (N) ou agrégé (agrégats HS1, 1h à 55°C) à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans du milieu AIM-V (Gibco, ThermoFisher Scientific). Les moDC chargées ont été ensuite lavées et mises en cultures avec les LT CD4^{+} naïfs au ratio 1/10 en présence d'IL-6 ($10\,000 \text{ U.mL}^{-1}$; R&D Systems, Minnesota, USA), d'IL-12 (10 ng.mL^{-1} ; R&D Systems) et de primocine ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$; Invivogen, California, USA) en milieu IMDM (*Iscove's modified Dulbecco's medium*; Gibco, ThermoFisher Scientific) supplémenté avec 10 % de sérum humain AB décomplémenté (Lonza, Suisse). Trois restimulations des LT CD4^{+} naïfs ont été réalisées avec des moDC autologues chargées avec l'anticorps natif ou agrégé, et maturées avec du LPS, en présence d'IL-2 (10 U.mL^{-1} ; R&D Systems) et d'IL-7 (5 ng.mL^{-1} ; R&D Systems). La KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*; ThermoFisher Scientific) a été utilisée comme contrôle positif. Une fréquence moyenne de 11,34 LT CD4^{+} naïfs spécifiques de la KLH par million de LT CD4^{+} naïfs circulants a été déterminée chez 3 donneurs.

ELISpot IFN- γ

Une semaine après la dernière restimulation, un ELISpot IFN- γ est réalisé et les puits contenant des lymphocytes spécifiques de l'anticorps natif ou agrégé sont détectés. Des plaques de nitrocellulose (96 puits; Merck Millipore, Massachusetts, USA) sont préalablement incubées avec un anticorps de capture IgG1 humain anti-IFN- γ (1-D1K; Mabtech, Suède). Les plaques sont ensuite saturées avec de l'IMDM contenant 10 % de sérum AB humain. Après 16 heures de co-culture entre les LT CD4^{+} et les moDC chargées avec les antigènes (KLH ou IFX N ou IFX HS1) ou non chargées (contrôle négatif), un anticorps secondaire biotinylé IgG1 murin anti-IFN- γ (7B6-1; Mabtech) est ajouté pour 2 heures à 37°C . Dans certaines expériences, les moDC ont été prétraitées pendant une heure avec un pool d'anticorps anti-CMH de classe II (DP, DQ et DR, chacun à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Les spots sont ensuite révélés après ajout d'extravidine et du substrat BCIP (Sigma Aldrich). Les spots sont comptés avec un lecteur de plaque ELISpot

(AID ELISpot Reader ; Mabtech). Un puits de LT est considéré positif -et donc contenant des cellules spécifiques de l'antigène- lorsque le nombre de spots est au moins le double que celui de la condition contrôle (moDC non chargées) avec un nombre minimal de 25 spots. La fréquence des LT spécifiques de l'antigène (IFX natif ou agrégé) est alors calculée en utilisant la loi statistique de Poisson :

$$\text{Fréquence} = \frac{-\ln (\text{nombre de puits négatifs}/\text{nombre total de puits testés})}{\text{nombre de LT déposés par puits}}$$

Analyses statistiques

Les comparaisons entre les données ont été réalisées par un test de Mann-Whitney, à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont considérés comme significativement différent pour un $p < 0,05$.

2.2. Résultats

Caractérisation des agrégats d'inflximab HS

Des agrégats ont été générés en soumettant l'IFX natif (à 1 mg.mL^{-1}) à un stress thermique (HS) à 55°C . Une cinétique a été réalisée afin de tester l'effet de la durée du stress (1, 2, 3, 4, 6 ou 24 heures) sur l'agrégation de l'IFX. Les agrégats formés ont été caractérisés par deux méthodes orthogonales (SEC et MFI) sur 3 échantillons indépendants.

L'analyse par SEC a montré une réduction de l'aire sous la courbe du monomère avec la durée de stress pour passer de $0,9 \text{ mg.mL}^{-1}$ de monomères restants après 1 heure de stress thermique (HS1) à moins de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ après 24 heures de stress (HS24) (figure 20a). L'analyse a également montré l'absence d'oligomères solubles. Ces résultats nous permettent d'estimer que la quantité d'agrégats insolubles formés augmente avec le temps parallèlement à la réduction de la concentration en monomères.

L'analyse par MFI a permis de déterminer la distribution de taille des particules présentes dans les solutions agrégées. La représentation de la fréquence des agrégats en fonction de leur taille a montré une distribution de tailles similaire entre les agrégats formés suite aux différentes durées de stress thermique (1, 2, 3, 4 et 6 heures) avec 75 % des agrégats ayant une taille inférieure à 11,5 μm . Pour simplifier, nous avons choisi de présenter la distribution de taille des agrégats HS1, HS6 et HS24 uniquement (figures 20 b et c). Toutefois, le stress thermique pendant 24 heures a induit la formation d'agrégats plus grands (figure 20b, HS24).

Ces résultats montrent que la quantité et la taille des agrégats d'IFX augmentent avec le temps lorsque la solution d'anticorps est soumise à un stress thermique.

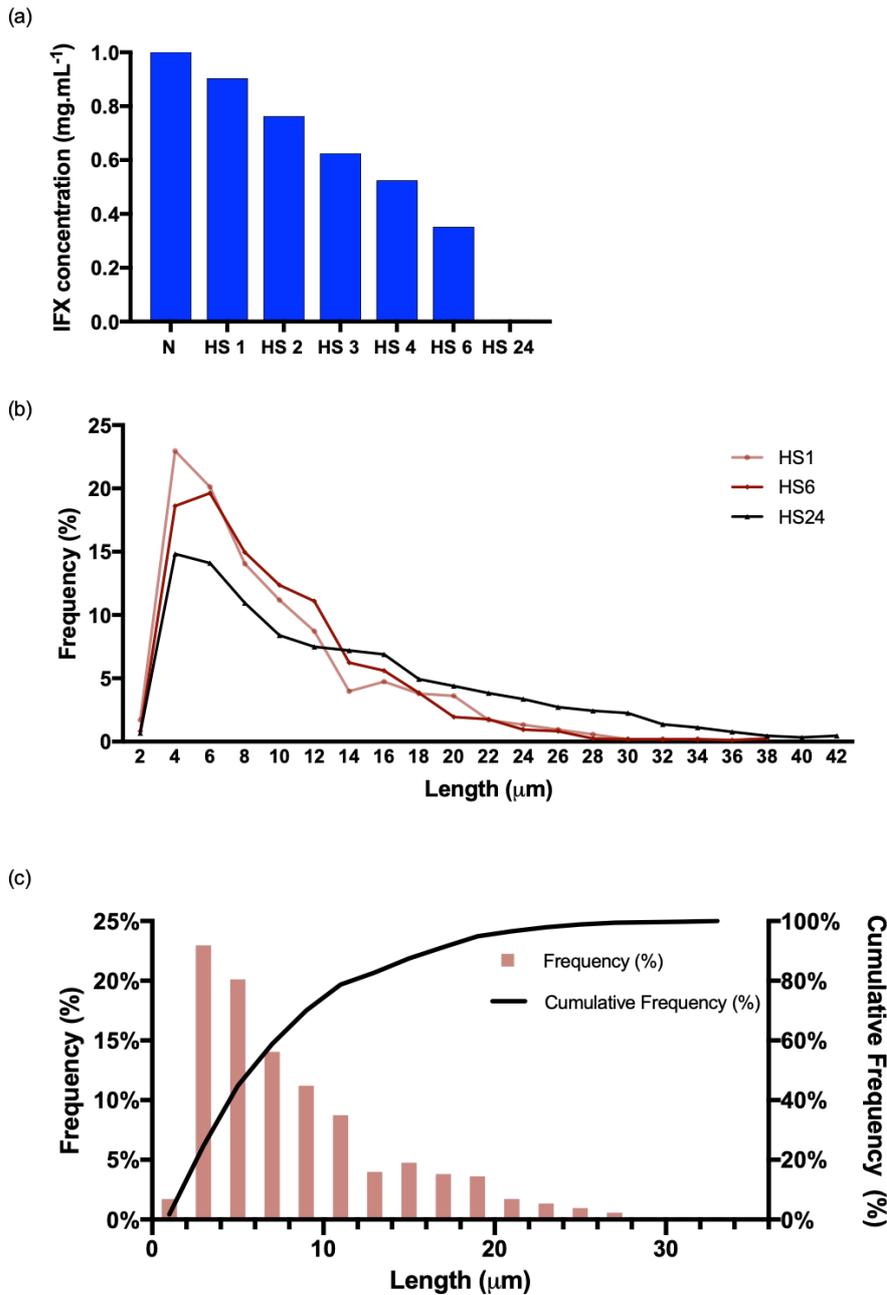


Figure 20 : Caractérisation des agrégats d’infliximab produits après stress thermique.

(a) Chromatographie d’exclusion stérique (SEC) : concentration d’infliximab restant sous forme monomérique après un stress thermique d’une durée variant entre 1 et 24 heures ; (b) Imagerie de flux par microscopie (MFI) : chaque courbe représente la distribution de taille pour une préparation d’agrégats d’infliximab produits après un stress thermique (1, 6 ou 24 heures) ; chaque point correspond à la fréquence des particules de taille déterminée ; (c) Imagerie de flux par microscopie (MFI) pour les agrégats HS1 : distribution de taille des agrégats d’infliximab produits après un stress thermique d’1 heure ; chaque barre correspond à la fréquence des particules de taille déterminée ; la courbe représente la fréquence cumulée
 HS : *heat stress*, le chiffre correspond à la durée du stress (1, 2, 3, 4, 6 ou 24 heures)

Activation des cellules dendritiques en réponse aux agrégats d’infliximab HS

Afin d’étudier l’effet des différentes préparations d’agrégats d’IFX sur la réponse des DC, nous avons analysé l’expression des marqueurs de surface CD83, CD86 et PD-L1 des moDC après

24 heures de traitement avec $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'IFX natif (N) ou d'IFX agrégés HS1, HS2, HS3, HS4, HS6 ou HS24, ou 25 ng.mL^{-1} de LPS comme témoin positif. La viabilité cellulaire évaluée par un marquage à l'iodure de propidium était supérieure à 75 % pour toutes les conditions.

L'analyse du phénotype des moDC a montré que les agrégats d'IFX HS3, HS4, HS6 et HS24 induisaient une augmentation significative de l'expression de CD83 et CD86 par rapport à l'IFX natif. L'expression de PD-L1 était augmentée en réponse aux agrégats IFX HS4, HS6 et HS24 uniquement. Par ailleurs, les agrégats IFX HS1 et HS2 n'induisaient pas d'augmentation significative de l'expression de ces marqueurs (figure 21).

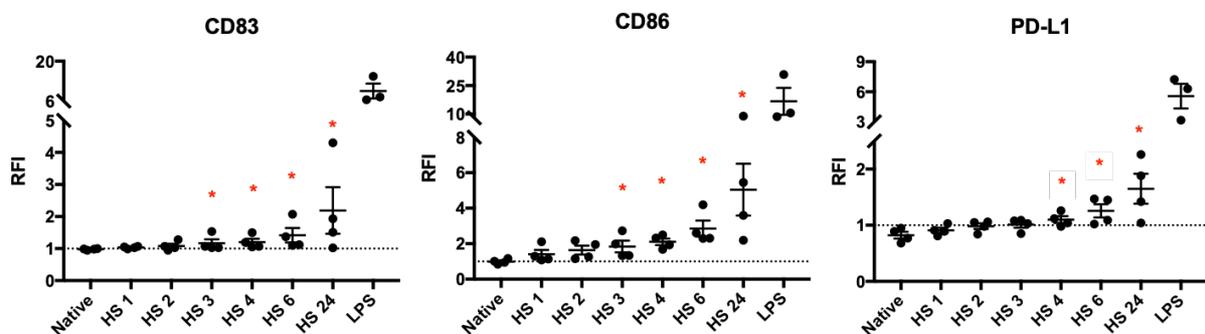


Figure 21 : Activation des cellules dendritiques en réponse aux agrégats d'infliximab HS.

Les moDC sont traités pendant 24 heures avec $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'IFX natif ou agrégé (HS1, HS2, HS3, HS4, HS6, HS24) ou 25 ng.mL^{-1} de LPS. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence relative (RFI) de l'expression des marqueurs de surface, mesurée par cytométrie en flux, des cellules traitées avec l'IFX natif ou agrégé par rapport aux cellules non traitées (n=4, * : $p < 0,05$; analyse statistique par le test de Mann-Whitney, comparant l'effet des agrégats d'IFX à celui de l'IFX natif).

Internalisation des agrégats d'infliximab HS par les cellules dendritiques

Les agrégats d'IFX produits sous stress thermique (55°C) pendant 1 heure (HS1) et 24 heures (HS24) ont été marqués à l'Alexa Fluor 488 (AF-IFX HS1 et AF-IFX HS24).

Les moDC ont été incubées avec $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'agrégats d'IFX marqués (AF-IFX HS1 et AF-IFX HS24) pendant 30, 60 et 120 minutes à 4°C ou 37°C . Nous avons analysé par cytométrie en flux l'émission de fluorescence associée aux moDC.

Les agrégats seuls apparaissent sur les graphes présentant la taille et la granularité (figure 22).

Nous observons que les agrégats HS1 (figure 22b) sont de taille inférieure à celle des moDC

(figure 22a) alors qu'une partie des agrégats HS24 (figure 22c) sont de la même taille que les moDC puisqu'ils apparaissent dans la fenêtre d'analyse dédiée aux cellules.

Lorsque les cellules sont incubées à 37°C, on observe une augmentation de la fluorescence mesurée par cytométrie en flux (figures 22 d et e) par HS1 et HS24. La fluorescence augmente avec le temps d'incubation et elle est plus importante pour les agrégats HS1 que par les agrégats HS24 (figures 22 d et e). Ces résultats suggèrent que les agrégats d'IFX seraient internalisés par les moDC et que cette internalisation augmente avec le temps.

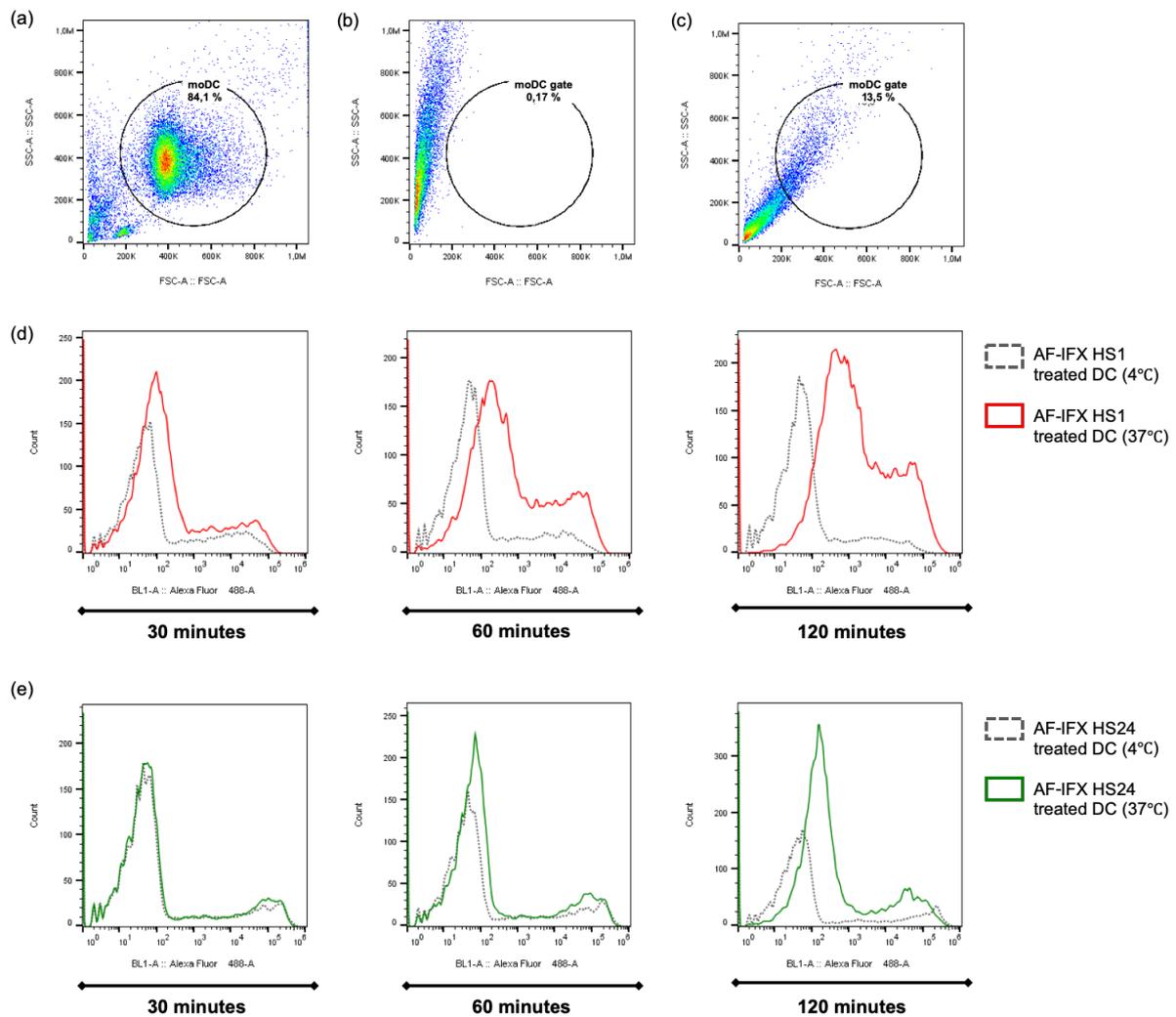


Figure 22 : Étude de l'internalisation des agrégats d'IFX HS1 et HS24 par les moDC par cytométrie en flux.

Les moDC sont incubées pendant 30, 60 ou 120 minutes à 4 ou 37°C avec $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'agrégats d'IFX HS1 ou HS24 marqués à l'Alexa Fluor 488 pour ensuite être lavées et analysées par cytométrie en flux ; (a) moDC non stimulées utilisées comme contrôle négatif ; (b) agrégats d'IFX HS1 ; (c) agrégats d'IFX HS24 ; (d) fluorescence des moDC incubées avec des agrégats HS1 pendant 30, 60 ou 120 minutes, à 4°C (gris) ou à 37°C (rouge) ; (e) moDC incubées avec des agrégats HS24 pendant 30, 60 ou 120 minutes, à 4°C (gris) ou à 37°C (vert).

Identification de LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'infliximab natif et agrégé HS1

Le modèle de co-culture autologues de moDC et de LT CD4⁺ naïfs a été utilisé pour identifier les LT spécifiques de l'IFX natif ou agrégé. Un schéma récapitulatif du protocole global est donné dans la figure 23.

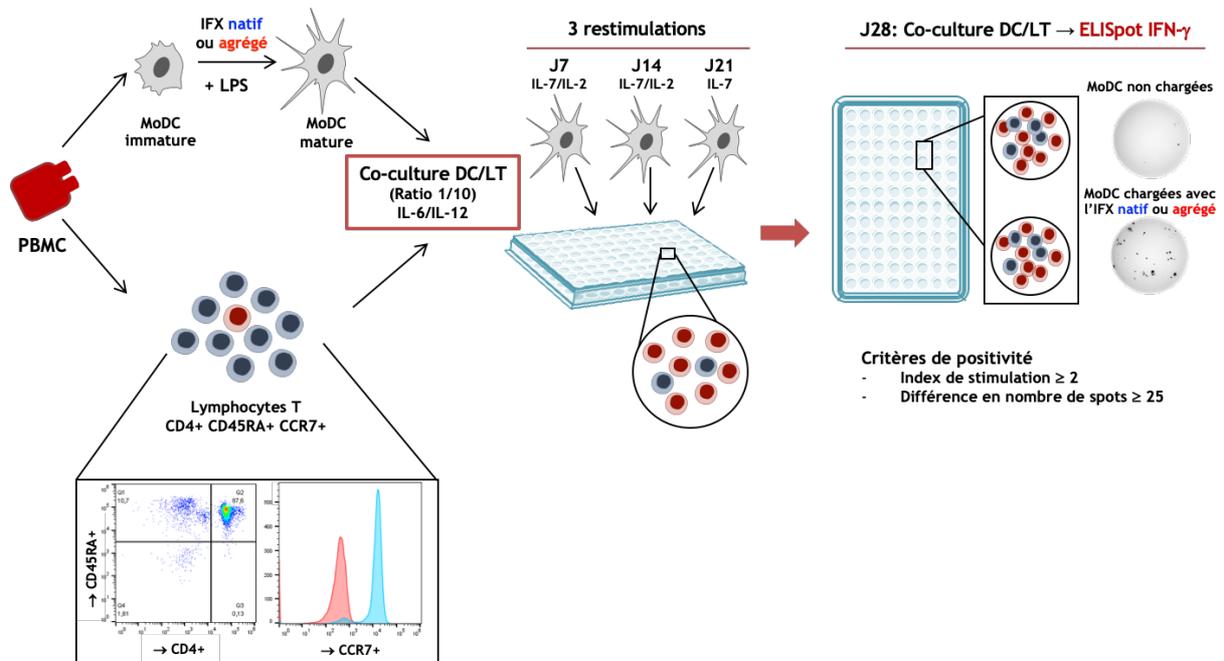


Figure 23 : Schéma récapitulatif du protocole de co-culture autologues de cellules dendritiques et de lymphocytes T CD4⁺ naïfs.

Pour étudier le répertoire de LT CD4⁺ reconnaissant spécifiquement les agrégats d'IFX en évitant au mieux un effet activateur des moDC, nous avons sélectionné les agrégats générés après 1 heure de stress à température élevée (IFX HS1) qui n'induisaient pas l'augmentation de l'expression des marqueurs de surface des moDC. Nous avons réalisé des co-cultures autologues de moDC et les LT CD4⁺ naïfs pour 5 donneurs différents. Pour chaque donneur, les LT CD4⁺ naïfs ont été mis en culture d'une part avec des moDC chargées avec l'IFX natif et d'autre part avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé HS1.

Ces co-cultures nous ont permis de détecter un répertoire de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif chez 4 des 5 donneurs testés (PM5, PM7, PM10 et PM11) avec une fréquence moyenne de 0,31 LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'IFX natif par million de LT CD4⁺ naïfs circulants.

D'autre part, nous avons également pu détecter un répertoire de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant les agrégats d'IFX HS1 chez les 5 donneurs testés (PM5, PM6, PM7, PM10 et PM11) avec une fréquence moyenne de 0,81 LT CD4⁺ naïfs spécifiques des agrégats d'IFX HS1 par million de LT CD4⁺ naïfs circulants (figure 24). Ces résultats suggèrent que la fréquence de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant les agrégats d'IFX serait plus élevée que celle des LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif.

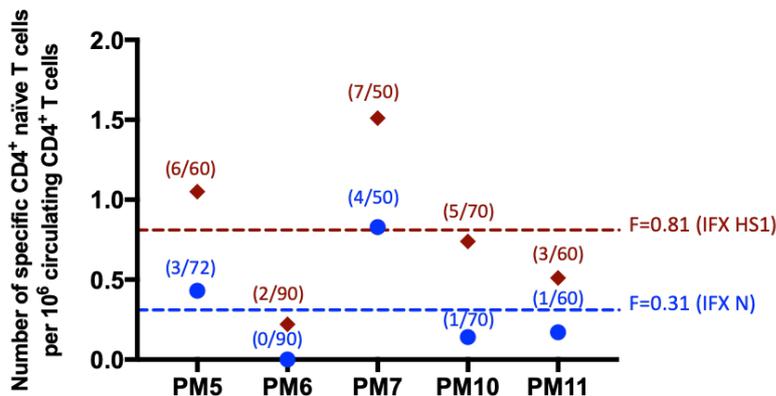


Figure 24 : Fréquence de LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'IFX natif ou agrégé HS1.

Fréquence de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif ou agrégé chez 5 donneurs différents. L'axe des ordonnées représente la fréquence calculée selon la loi de Poisson et l'axe des abscisses représente les différents donneurs. Le nombre de puits positifs parmi ceux testés pour chaque donneur est représenté entre parenthèses.

Les résultats du donneur PM5 sont présentés dans les figures 25 et 26 ci-dessous comme expérience représentative des 5 donneurs testés.

Les LT CD4⁺ naïfs mis en culture pendant 28 jours avec des moDC chargées avec l'IFX natif ont été testés pour évaluer leur capacité à reconnaître l'IFX natif, et ceci en réalisant un premier ELISpot IFN- γ . Dans cet ELISpot 1, les LT ont été stimulés avec des moDC non chargées ou des moDC chargées avec l'IFX natif. Les résultats montrent que sur les 72 puits de LT naïfs testés, 3 étaient positifs selon le critère indiqué dans la section matériel & méthodes et donc capables de reconnaître l'IFX natif (figure 25a). Un second ELISpot a été réalisé sur les LT de ces 3 puits positifs pour évaluer leur capacité à reconnaître l'IFX agrégé HS1. Dans cet ELISpot 2, les LT ont été stimulés avec des moDC non chargées, ou des moDC chargées avec l'IFX

natif, ou avec l'IFX agrégé HS1. Les résultats obtenus montrent que 2 de ces 3 puits sont positifs pour l'IFX natif et pour l'IFX agrégé. Ceci indique que les LT de ces puits positifs ont également été capables de reconnaître des motifs communs entre IFX natif et agrégé (figure 25b).

Pour l'ensemble des 5 donneurs, les résultats de réactivité croisée avec l'IFX agrégé HS1 des LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif sont présentés dans la figure 25c.

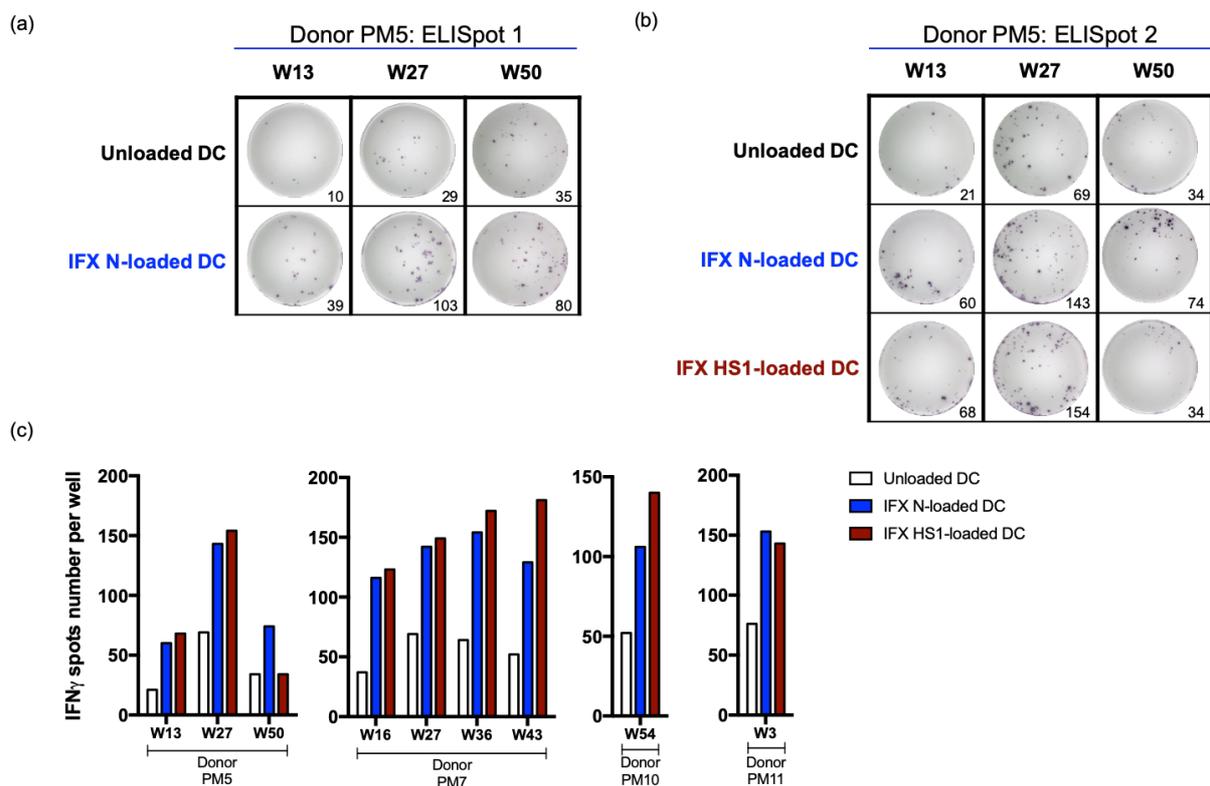


Figure 25 : Détection des LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif et réactivité croisée avec la forme agrégée HS1.

Les LT CD4⁺ naïfs ont été mis en culture pendant 28 jours avec des moDC chargés avec l'IFX natif. La spécificité de la réponse de ces LT a été évaluée après 28 jours par des ELISpot IFN- γ .

(a, b) Images et nombre de spots IFN- γ des puits positifs détectés pour le donneur PM5, (a) ELISpot 1 : les LT ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC) ; (b) ELISpot 2 : les LT des puits détectés positifs en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC) ou avec l'IFX agrégé HS1 (IFX HS1-loaded DC) ;

(c) Nombre de spots IFN- γ pour les puits positifs (well désigné par W) détectés en ELISpot 2 chez les 5 donneurs testés où les LT des puits détectés positifs en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC) ou avec l'IFX agrégé HS1 (IFX HS1-loaded DC).

Par ailleurs, les LT CD4⁺ naïfs mis en culture pendant 28 jours avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé HS1 ont été testés pour évaluer leur capacité à reconnaître l'IFX agrégé HS1, et ceci en réalisant un premier ELISpot IFN- γ . Dans cet ELISpot 1, les LT ont été stimulés avec des moDC non chargées ou des moDC chargées avec l'IFX agrégé HS1. Les résultats montrent que sur les 60 puits de LT naïfs testés, 6 étaient positifs et donc capables de reconnaître l'IFX agrégé HS1 (figure 26a). Un second ELISpot a été réalisé sur les LT de ces 6 puits positifs pour évaluer leur capacité à reconnaître l'IFX natif. Dans cet ELISpot 2, les LT ont été stimulés avec des moDC non chargées ou des moDC chargées avec l'IFX agrégé HS1, ou avec l'IFX natif. Les résultats obtenus montrent que 3 de ces 6 puits sont uniquement positifs pour l'IFX agrégé HS1 (figure 26b).

Pour les 5 donneurs, les résultats de réactivité croisée avec l'IFX natif des LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX agrégé HS1 sont présentés dans la figure 26c. Pour chaque donneur, nous détectons certains puits de LT spécifiques uniquement des agrégats d'IFX HS1 alors que d'autres reconnaissent également l'IFX natif. Ces résultats suggèrent que la spécificité de la réponse vis à vis des agrégats serait due à la reconnaissance de peptides dérivant de l'anticorps agrégé.

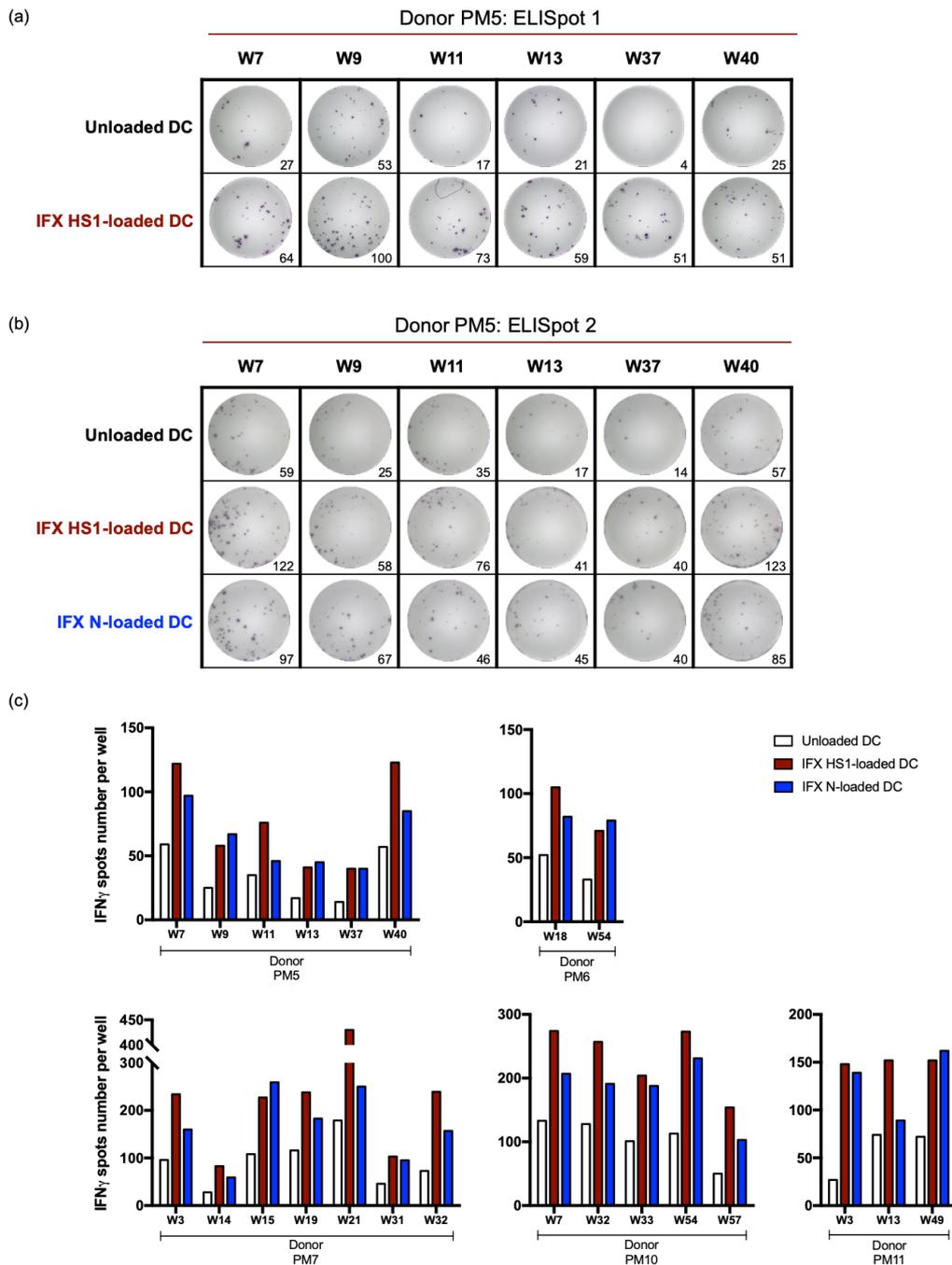


Figure 26 : Détection des LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX agrégé HS1 et réactivité croisée avec la forme native.

Les LT CD4⁺ naïfs ont été mis en culture pendant 28 jours avec des moDC chargés avec l'IFX agrégé HS1. La spécificité de la réponse de ces LT a été évaluée après 28 jours par des ELISpot IFN- γ .

(a, b) Images et nombre de spots IFN- γ des puits positifs détectés pour le donneur PM5, (a) ELISpot 1 : les LT ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé HS1 (IFX HS1-loaded DC) ; (b) ELISpot 2 : les LT des puits détectés positifs en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé HS1 (IFX HS1-loaded DC) ou avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC) ;

(c) Nombre de spots IFN- γ pour les puits positifs (well désigné par W) détectés en ELISpot 2 chez les 5 donneurs testés où les LT des puits détectés positifs en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé HS1 (IFX HS1-loaded DC) ou avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC).

Afin de vérifier l'implication des molécules du CMH de classe II dans l'activation des LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'IFX natif ou agrégé, nous avons réalisé un ELISpot IFN- γ sur les puits positifs détectés par l'ELISpot 1 pour le donneur PM7. Les moDC ont été prétraitées avec un pool d'anticorps bloquants des molécules du CMH de classe II (DP, DQ et DR) et ensuite chargées avec l'IFX natif ou agrégé HS1. La révélation de l'ELISpot a permis de confirmer la positivité des LT reconnaissant l'IFX natif ou agrégé et de montrer l'inhibition de l'activation des LT suite à la neutralisation des molécules du CMH de classe II, ce qui confirme que la réponse lymphocytaire détectée est dépendante des molécules du CMH (figure 27).

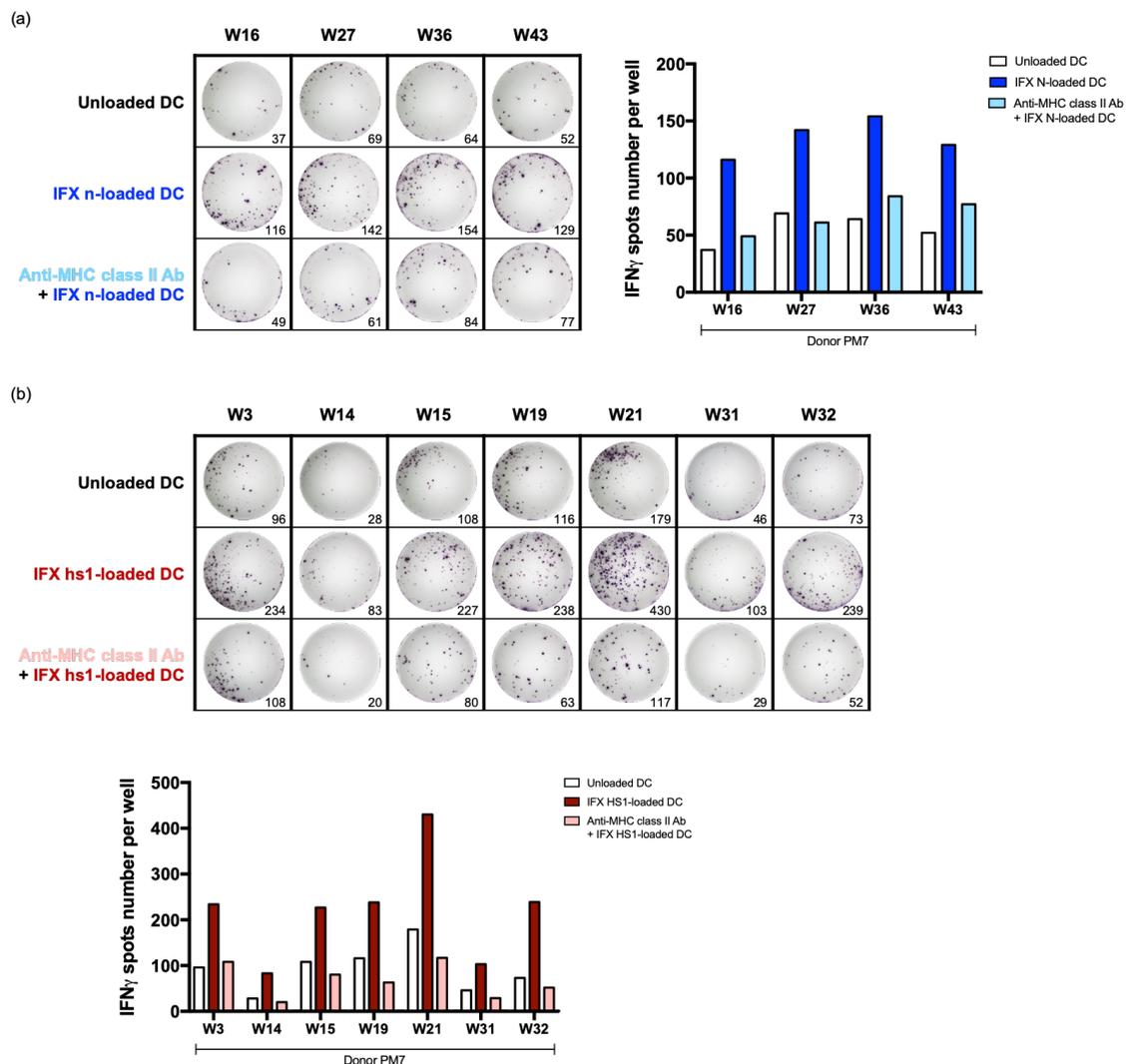


Figure 27 : Implication des molécules du CMH de classe II dans l'activation des LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif ou agrégé.

Les LT CD4⁺ naïfs ont été mis en culture pendant 28 jours avec des moDC chargés avec l'IFX natif ou agrégé HS1. La spécificité de la réponse de ces LT a été évaluée après 28 jours par des ELISpot IFN- γ . Un premier ELISpot a permis de détecter les puits positifs contenant les LT spécifiques de l'IFX natif ou agrégé HS1. L'implication des molécules du CMH II dans l'activation des LT spécifiques a ensuite été évaluée par un deuxième ELISpot IFN- γ .

(a, b) Images et nombre de spots IFN- γ des puits positifs détectés pour le donneur PM7, (a) LT spécifiques de l'IFX natif : les LT des puits détectés positifs pour l'IFX natif en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC) ou avec des moDC prétraitées avec un pool d'anticorps anti-CMH II (DP, DQ et DR) et chargées avec l'IFX natif (Anti-MHC class II Ab + IFX N-loaded DC) ; (b) LT spécifiques de l'IFX agrégé HS1 : les LT des puits détectés positifs pour l'IFX agrégé HS1 en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé HS1 (IFX HS1-loaded DC) ou avec des moDC prétraitées avec un pool d'anticorps anti-CMH II (DP, DQ et DR) et chargées avec l'IFX agrégé HS1 (Anti-MHC class II Ab + IFX HS1-loaded DC).

3. Partie 2 : Cas des oligomères solubles

3.1. Matériel et Méthodes

Production des agrégats

L'infliximab lyophilisé (Remicade[®], IFX), disponible sur le marché, a été reconstitué à une concentration de 10 mg.mL⁻¹ avec de l'eau stérile. Pour induire la formation d'agrégats, les échantillons ont été dilués à 1 mg.mL⁻¹ avec une solution de chlorure de sodium à 0,9 % et soumis à un stress de lumière ultraviolet (UV) à 365 nm pendant 1, 2, 5, 9, 14, 17 et 20 heures. Les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à leur emploi. La stabilité des agrégats a été vérifiée par des mesures de taille utilisant la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) avant et après congélation et aucune modification n'a été observée.

Caractérisation des agrégats

La caractérisation a été réalisée à l'aide d'une méthode précédemment décrite (SEC).

L'analyse par SEC des agrégats UV a permis de calculer le pourcentage d'oligomères solubles sortant de la colonne en comparant l'aire sous la courbe de chaque pic avec celle correspondant au monomère.

Co-culture autologue de cellules dendritiques et lymphocytes T

Comme précédemment décrit, les cellules sont isolées de donneurs sains. Les moDC sont chargées avec l'IFX natif (N) ou agrégé sous un stress de lumière UV pendant 20 heures (UV) en présence du LPS sur la nuit et ensuite mises en culture avec les LT CD4⁺ naïfs isolés du même donneur en présence du cocktail cytokinique approprié. Trois re-stimulations de ces LT sont réalisées avec les moDC chargées, pour amplifier la réponse T spécifique.

ELISpot IFN- γ

Comme précédemment décrit, un ELISpot IFN- γ est réalisé une semaine après la dernière re-stimulation et les lymphocytes spécifiques de l'anticorps natif (N) ou agrégé (UV) sont détectés.

3.2. Résultats

Caractérisation des agrégats d'infliximab UV

Des agrégats ont été préparés en soumettant l'IFX natif (à 1 mg.mL⁻¹) à un stress de lumière UV pendant 1, 2, 5, 9, 14, 17 et 20 heures. Les agrégats formés ont été caractérisés par la méthode d'exclusion stérique (SEC) sur 3 échantillons indépendants. L'analyse a permis de montrer une diminution du pic de monomères avec le temps et la détection de dimères dès 2 heures de stress et de trimères dès 9 heures de stress (figure 28a). Ainsi, la cinétique réalisée montre une augmentation de la quantité d'agrégats solubles (dimères et oligomères) avec le temps. Ces résultats nous ont permis de sélectionner la durée de 20 heures pour le stress UV pour les expériences de co-cultures autologues, en raison de la perte de monomères au profit de l'apparition de dimères et d'oligomères solubles (figure 28b).

La préparation et la caractérisation des agrégats IFX UV ont été réalisées en collaboration avec l'équipe « Protéines et Nanotechnologies en Sciences Analytiques » de l'UMR CNRS 8612. La caractérisation doit être complétée par l'analyse des échantillons avec la méthode d'imagerie de flux par microscopie (MFI) pour confirmer l'absence d'agrégats de taille micrométrique.

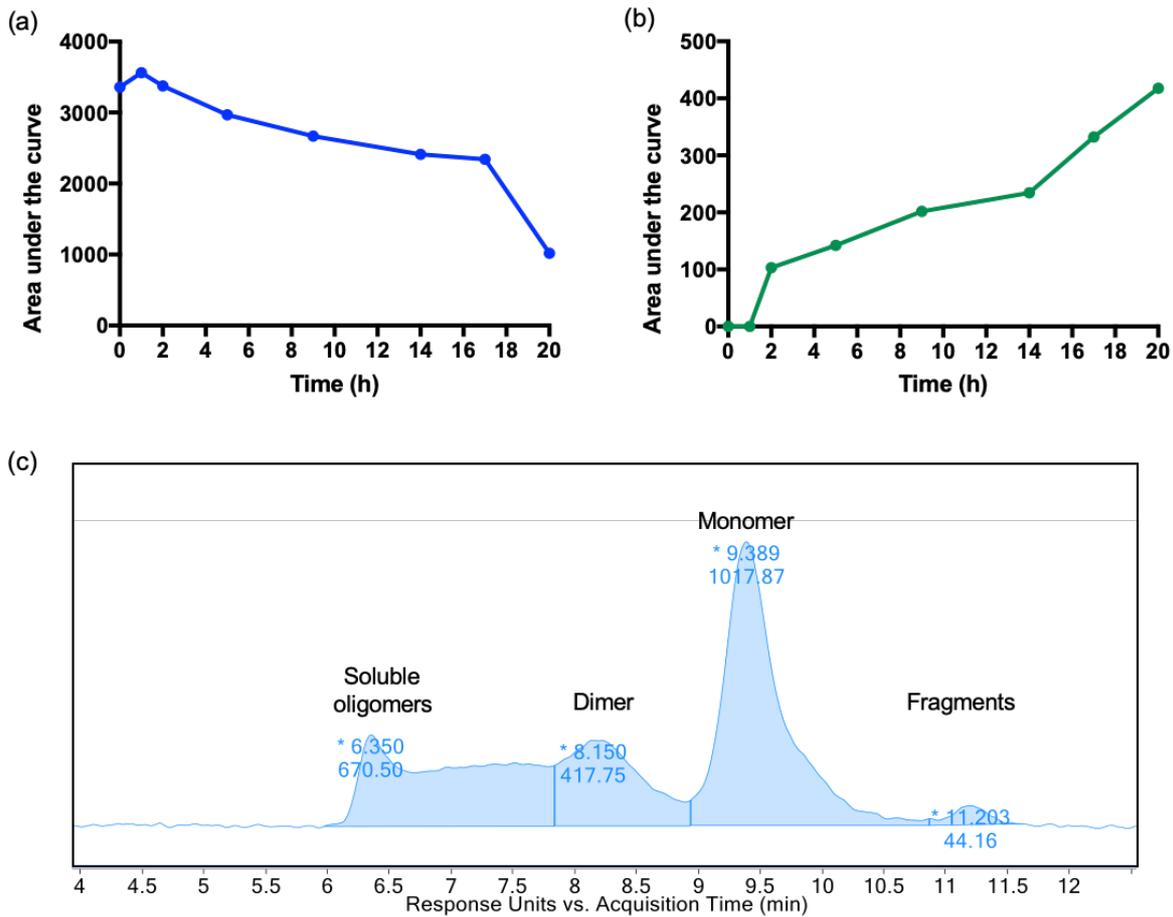


Figure 28 : Caractérisation des agrégats d’infliximab produits sous stress de lumière UV par chromatographie d’exclusion stérique.

(a) Aires sous la courbe des pics de monomères détectés par SEC en fonction de la durée du stress UV ; (b) Aires sous la courbe des pics de dimères détectés par SEC en fonction de la durée du stress UV ; (c) Représentation des pics détectés par SEC lors de l’analyse d’une préparation d’agrégats d’infliximab produits sous un stress de lumière UV pendant 20 heures, les temps de rétention des particules sont précisés sur la courbe (*), les valeurs des aires sous la courbe pour chaque pic sont également indiquées.

Identification de LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l’infliximab natif et agrégé UV

Pour étudier le répertoire de LT CD4⁺ reconnaissant l’IFX agrégé UV (dimères et oligomères solubles), nous avons réalisé des co-cultures autologues de moDC et les LT CD4⁺ naïfs pour 3 donneurs différents. Pour chaque donneur, les LT CD4⁺ naïfs ont été mis en culture d’une part avec des moDC chargées avec l’IFX natif et d’autre part avec des moDC chargées avec l’IFX agrégé UV préparé en soumettant l’IFX à 20 heures de stress.

Ces co-cultures nous ont permis de détecter un répertoire de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l’IFX natif chez 1 des 3 donneurs testés (PL4). D’autre part, nous avons également pu détecter un

répertoire de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant les agrégats d'IFX UV chez les 3 donneurs testés (PL1, PL4 et PL5) (figure 29). Ces résultats préliminaires suggèrent que la fréquence de LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'IFX agrégé UV serait supérieure à celle des LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'IFX natif.

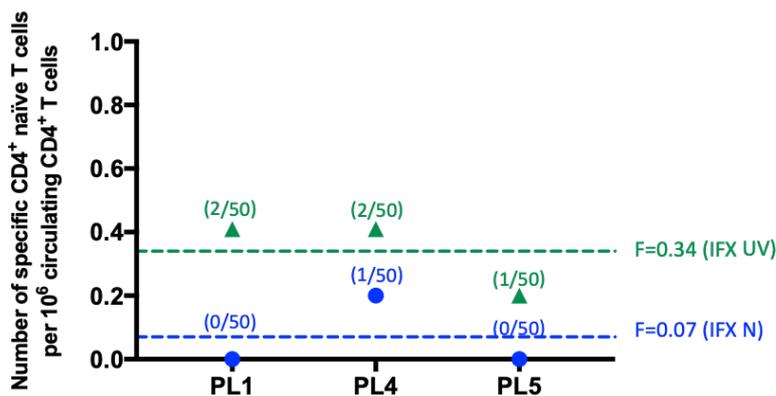


Figure 29 : Fréquence de LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'IFX natif ou agrégé UV.

Fréquence de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif ou agrégé chez 3 donneurs différents. L'axe des ordonnées représente la fréquence calculée selon la loi de Poisson et l'axe des abscisses représente les différents donneurs. Le nombre de puits positifs pour chaque donneur est donné entre parenthèses.

Les résultats du donneur PL4 sont présentés dans les figures 30 et 31 ci-dessous comme expérience représentative des 3 donneurs testés.

Les LT CD4⁺ naïfs mis en culture pendant 28 jours avec des moDC chargées avec l'IFX natif ont été testés pour évaluer leur capacité à reconnaître l'IFX natif, et ceci en réalisant un premier ELISpot IFN- γ . Dans cet ELISpot 1, les LT ont été stimulés avec des moDC non chargées ou des moDC chargées avec l'IFX natif. Les résultats montrent que sur les 50 puits de LT naïfs testés, 1 était positif et donc capable de reconnaître l'IFX natif (figure 30a). Un second ELISpot a été réalisé sur les LT de ce puits positif pour évaluer leur capacité à reconnaître l'IFX agrégé UV. Dans cet ELISpot 2, les LT ont été stimulés avec des moDC non chargées ou des moDC chargées avec l'IFX natif, ou avec l'IFX agrégé UV. Les résultats obtenus montrent que ce puits est positif pour l'IFX natif et pour l'IFX agrégé UV. Ceci indique que les LT de ce puits

ont également été capables de reconnaître des motifs communs entre IFX natif et agrégé (figures 30 b et c).

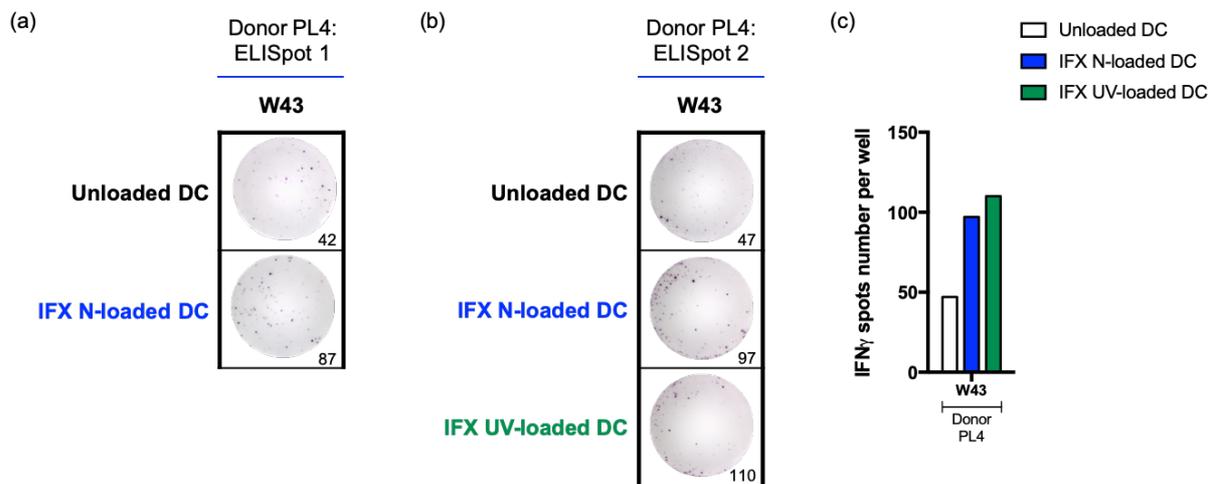


Figure 30 : Détection des LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX natif et réactivité croisée avec la forme agrégée UV.

Les LT CD4⁺ naïfs ont été mis en culture pendant 28 jours avec des moDC chargés avec l'IFX natif. La spécificité de la réponse de ces LT a été évaluée après 28 jours par des ELISpot IFN- γ .

(a, b) Images et nombre de spots IFN- γ du puits positif détecté pour le donneur PL4, (a) ELISpot 1 : les LT ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC) ; (b) ELISpot 2 : les LT du puits détecté positif en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC) ou avec l'IFX agrégé UV (IFX UV-loaded DC) ;

(c) Nombre de spots IFN- γ pour les puits positifs (well désigné par W) détectés en ELISpot 2 chez les 3 donneurs testés où les LT du seul puits détecté positif en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC) ou avec l'IFX agrégé UV (IFX UV-loaded DC).

Par ailleurs, les LT CD4⁺ naïfs mis en culture pendant 28 jours avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé UV ont été testés pour évaluer leur capacité à reconnaître l'IFX agrégé UV, et ceci en réalisant un premier ELISpot IFN- γ . Dans cet ELISpot 1, les LT ont été stimulés avec des moDC non chargées ou des moDC chargées avec l'IFX agrégé UV. Les résultats montrent que sur les 50 puits de LT naïfs testés, 2 étaient positifs et donc capables de reconnaître l'IFX agrégé UV (figure 31a). Un second ELISpot a été réalisé sur les LT de ces 2 puits positifs pour évaluer leur capacité à reconnaître l'IFX natif. Dans cet ELISpot 2, les LT ont été stimulés avec des moDC non chargées ou des moDC chargées avec l'IFX agrégé UV, ou avec l'IFX natif.

Les résultats obtenus montrent que ces puits étaient négatifs pour l'IFX natif indiquant que les LT n'ont pas été capables de reconnaître l'IFX natif (figure 31b).

Les résultats de réactivité croisée avec l'IFX natif des LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX agrégé UV détectés chez les 3 donneurs sont présentés dans la figure 31c. Pour 2 des 3 donneurs (PL1 et PL4), nous détectons des LT spécifiques uniquement des agrégats d'IFX UV, ce qui suggère la reconnaissance de peptides dérivant de la forme agrégée de l'IFX. Dans le cas du troisième donneur (PL5), les LT reconnaissent à la fois l'IFX natif et agrégé, ce qui indique que les peptides présentés par les moDC et reconnus par les LT sont communs aux préparations d'IFX natif et agrégé UV.

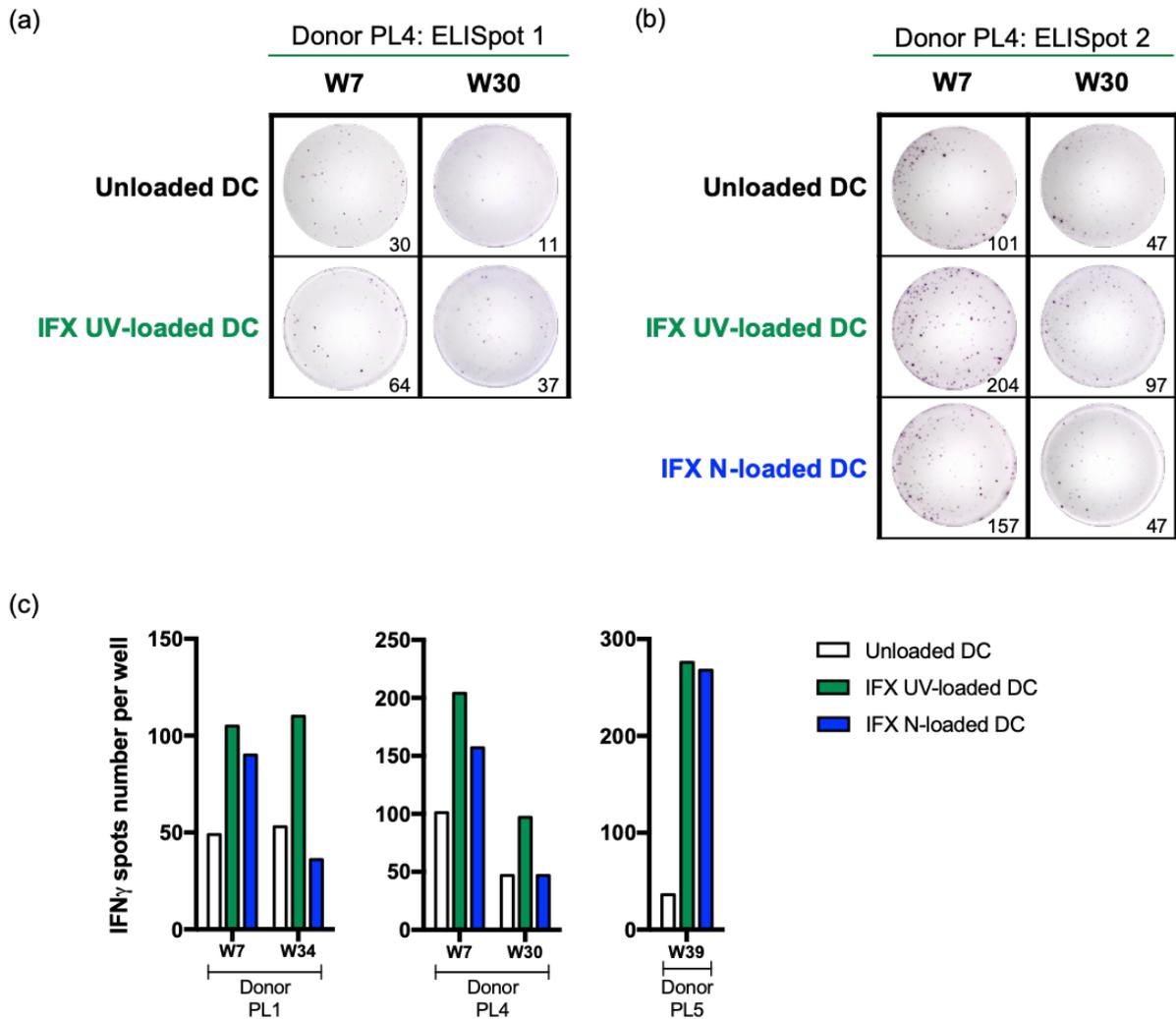


Figure 31 : Détection des LT CD4⁺ naïfs reconnaissant l'IFX agrégé UV et réactivité croisée avec la forme native.

Les LT CD4⁺ naïfs ont été mis en culture pendant 28 jours avec des moDC chargés avec l'IFX agrégé UV. La spécificité de la réponse de ces LT a été évaluée après 28 jours par des ELISpot IFN- γ .

(a, b) Images et nombre de spots IFN- γ des puits positifs détectés pour le donneur PL4, (a) ELISpot 1 : les LT ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé UV (IFX UV-loaded DC) ; (b) ELISpot 2 : les LT des puits détectés positifs en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé UV (IFX UV-loaded DC) ou avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC) ;

(c) Nombre de spots IFN- γ pour les puits positifs (well désigné par W) détectés en ELISpot 2 chez les 2 donneurs testés où les LT des puits détectés positifs en ELISpot 1 ont été mis en culture avec des moDC non chargées (Unloaded DC) ou avec des moDC chargées avec l'IFX agrégé UV (IFX UV-loaded DC) ou avec l'IFX natif (IFX N-loaded DC).

DISCUSSION

L'objectif de ce travail de thèse était d'approfondir notre compréhension du rôle des agrégats de protéines thérapeutiques dans leur immunogénicité. Différentes études ont montré que la présence d'agrégats dans les préparations de biomédicaments pouvait favoriser le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique (Kraus et al., 2019). Notre travail a permis d'étudier cette réponse en évaluant l'interaction des agrégats avec les DC et ses conséquences sur la réponse lymphocytaire.

Ainsi, nous avons testé différents types de stress pour préparer des agrégats d'anticorps que nous avons caractérisés par des méthodes physico-chimiques orthogonales afin d'estimer pour chaque préparation la quantité, la structure et la taille des agrégats formés (Mahler et al., 2009). Par la suite, nous avons étudié l'effet des agrégats sur la réponse immunitaire, et plus particulièrement sur la maturation des DC et par conséquent sur l'activation des LT en utilisant des modèles *in vitro* de co-cultures autologue et allogénique de moDC et de LT CD4⁺.

Notre équipe était partenaire dans le consortium européen ABIRISK (2012-2018), financé par l'*Innovative Medicine Initiative*. L'objectif de ce consortium était de développer une approche intégrative pour l'étude de l'immunisation des patients aux biomédicaments. En partenariat avec des industriels (Novartis et Bayer), nous avons étudié l'effet de quatre anticorps thérapeutiques (infliximab, rituximab, adalimumab, natalizumab) et de leurs agrégats produits par différents types de stress sur la modulation de la réponse des moDC. Les modifications phénotypiques des moDC ont été évaluées en mesurant différents paramètres dont l'expression des marqueurs membranaires d'activation (CD83) et de costimulation (CD86), l'expression des ARNm et la sécrétion de cytokines et chimiokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF α , CCL3 et CCL4), et l'activation de voies de signalisation (Syk, Akt, ERK). Les résultats obtenus ont montré entre autres que l'infliximab, anticorps monoclonal chimérique anti-TNF α , était le plus susceptible à l'agrégation et que ceci corrélait avec le plus fort niveau de maturation des moDC induit par les agrégats (Morgan et al., 2019), (Annexe II). Partant de ces résultats, nous avons

choisi l'infliximab comme modèle pour la préparation des agrégats et l'étude de leur immunogénicité dans ce travail de thèse. Dans la pratique clinique, jusqu'à 58 % des patients traités par cet anticorps développent des ADA pouvant conduire à la perte de son efficacité clinique (Ungar et al., 2014; Van Stappen et al., 2018). Concernant son agrégation, l'étude de la structure cristalline de l'infliximab a montré un potentiel d'auto-association par ses fragments Fab (Lerch et al., 2017). De plus, il a été montré que la formation d'agrégats d'infliximab lorsqu'il est soumis à un stress de température élevée est due au dépliement de l'anticorps et l'exposition de ses sites hydrophobes (Pisupati et al., 2017).

1. Évaluation des mécanismes cellulaires impliqués dans l'activation des cellules dendritiques humaines et des lymphocytes T par les agrégats d'infliximab

Dans la première partie de notre travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes précoces de signalisation impliqués dans la reconnaissance des agrégats protéiques comme signal de danger par les DC et leur effet sur la réponse lymphocytaire.

Nous avons préparé des agrégats d'infliximab en soumettant l'anticorps concentré à 10 mg.mL^{-1} à un stress de température élevée. La caractérisation des préparations d'agrégats a montré que ce stress a abouti à une réduction de 95 % de la concentration en monomères d'infliximab. Cette perte de monomères était associée à la formation d'agrégats insolubles de taille supérieure à $1 \mu\text{m}$. Parmi ces agrégats, ceux ayant une taille de 5 à $15 \mu\text{m}$ constituaient une population majoritaire, mais des agrégats de tailles supérieures allant jusqu'à plus de $200 \mu\text{m}$ étaient également présents dans les préparations. Plusieurs études comparant différents types de stress ont montré que des températures élevées pouvaient conduire à la dénaturation des anticorps et la formation de quantité élevée d'agrégats (Hawe et al., 2009; Joubert et al., 2011; Telikepalli et al., 2014). Joubert et collaborateurs ont également montré que les stress thermiques favorisaient l'apparition d'agrégats insolubles de taille importante pouvant aller de 1 à plus de $100 \mu\text{m}$ (Joubert et al., 2011). Par ailleurs, le stress thermique que nous avons choisi pour notre

étude a préalablement été testé au cours de l'étude ABIRISK où les agrégats d'infliximab préparés induisaient l'activation des moDC (Morgan et al., 2019). Le choix de ce modèle d'agrégats était donc basé sur la mise évidence que les particules formées joueraient un rôle de signal de danger reconnu par les DC et l'objectif était d'évaluer les mécanismes cellulaires et moléculaires précoces impliqués dans le déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative. Une fois les agrégats caractérisés, nous avons confirmé leur effet sur le phénotype des moDC. Nous avons montré qu'ils induisaient une augmentation concentration-dépendante de l'expression des marqueurs de surface, notamment les marqueurs de costimulation CD86 et d'activation CD83 et le récepteur aux chimiokines CXCR4. Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature où l'activation des moDC se traduit par la modulation d'expression de CD83 et CD86 en réponse aux agrégats de protéines thérapeutiques dont la GH recombinante humaine, le rituximab et d'autres anticorps monoclonaux IgG (Gallais et al., 2017; Rombach-Riegraf et al., 2014). L'augmentation de l'expression du CXCR4 est également le signe de la maturation des moDC comme en réponse aux signaux de danger, tels que le LPS (Kabashima et al., 2007).

Par ailleurs, nous avons montré une augmentation de la sécrétion des cytokines IL-6, IL-8, IL-12p40 et IFN β et des chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL17 et CCL22 par les moDC incubées avec les agrégats d'infliximab. Nous pouvons noter une concordance entre la signature cytokinique des moDC que nous déterminons et celle mise en évidence en présence d'autres anticorps thérapeutiques agrégés tels que le rituximab et une IgG1 humaine (Gallais et al., 2017). De plus, une partie de ces protéines (IL-6, CCL2, CCL3 et CCL4) est également sécrétée par des PBMC stimulés avec des agrégats d'anticorps monoclonaux (Joubert et al., 2012). Ces PBMC sécrètent également de l'IL-1 β , l'IL-10 et le TNF α en réponse aux agrégats, alors que la production de ces cytokines est très faible dans notre modèle de DC. Les PBMC sont riches en monocytes qui peuvent être les cellules principales sécrétrices des cytokines et chimiokines.

Toutefois, les monocytes et les DC peuvent sécréter les mêmes protéines inflammatoires en réponse aux signaux de danger (Arango Duque and Descoteaux, 2014; Blanco et al., 2008). Les différences dans les molécules sécrétées peuvent probablement s'expliquer par la différence entre les types d'agrégats de protéines utilisés. Ainsi, en fonction de la protéine et du stress appliqué, les agrégats formés peuvent différer en taille, en structure et en quantité et la réponse cellulaire à ses agrégats dépendrait de ces paramètres. En d'autres termes, la diversité des agrégats générés par ce type de stress « exagéré » peut induire l'activation des cellules de différentes manières : diversité des récepteurs engagés, diversité des voies de signalisation activées, qui finalement aboutiraient à des profils cytokiniques différents. Un exemple est donné par les agrégats de GH obtenus suite à un stress d'agitation, qui induisaient majoritairement la sécrétion de CXCL10 par les moDC, alors que les agrégats de rituximab formés suite au même stress, n'augmentaient pas la sécrétion de cette chimiokine (Gallais et al., 2017). D'autre part, et de manière intéressante, nous avons montré que les agrégats d'infliximab induisaient une sécrétion de TNF α similaire à celle des cellules non stimulées alors qu'en présence d'infliximab natif la production de TNF α était abolie. Ceci suggère que l'infliximab agrégé a perdu son activité biologique intrinsèque anti-TNF α , mais qu'il peut agir comme signal de danger pour activer les DC.

Ayant confirmé la maturation des moDC en réponse aux agrégats d'infliximab, nous avons ensuite montré que les modifications phénotypiques des moDC induites étaient suffisantes pour induire la prolifération des LT et la production des cytokines IL-5, IL-13 et IL-9 dans un modèle de co-culture allogénique de moDC et de LT CD4⁺. D'autres études se sont également intéressées à la réponse lymphocytaire aux agrégats protéiques. En utilisant le même modèle, Gallais et collaborateurs ont montré une augmentation de la prolifération des LT mis en culture avec des moDC stimulées avec des agrégats protéiques produits sous stress d'agitation (GH recombinante humaine, rituximab et IgG1 humaine). Toutefois, la sécrétion cytokinique par les

LT peut différer selon la nature des agrégats testés. Ainsi, les préparations d'agrégats de rituximab et d'IgG1 induisaient la sécrétion des cytokines IL-5, IL-13, IL-17A et IFN- γ alors que les agrégats de GH provoquaient uniquement la production d'IFN- γ (Gallais et al., 2017). Comme précisé plus haut, le profil cytokinique n'était pas tout à fait identique entre les moDC exposées aux agrégats de GH et celles exposées aux agrégats d'anticorps. En plus de l'IL-12p40 produite par les moDC, la production de CXCL10 en réponse aux agrégats de GH pouvait également favoriser la production d'IFN- γ par les LT et réduire celle d'IL-5 et d'IL-13. En effet, il a été montré que CXCL10 favorisait l'expression du facteur de transcription *T-bet* et augmentait donc la sécrétion d'IFN- γ tout inhibant l'expression de *GATA-3* et ainsi la production d'IL-4, IL-5 et IL-13 (Romagnani et al., 2005). Ces observations pourraient partiellement expliquer nos résultats obtenus avec les agrégats d'infliximab qui n'induisaient pas la production de CXCL10 par les moDC. Toutefois, il serait intéressant d'évaluer l'expression des facteurs de transcription des LT pour pouvoir déterminer leur polarisation. Par ailleurs, Joubert et collaborateurs ont évalué la réponse des LT en exposant des PBMC humaines aux agrégats d'anticorps. Ces études ont montré une augmentation de la prolifération des LT et la sécrétion de différentes cytokines : IFN- γ , IL-2, IL-13 et TNF α (Joubert et al., 2012, 2016). Ces résultats confirment donc le rôle de signal de danger des agrégats protéiques qui activent les CPA, notamment les DC, de façon à pouvoir favoriser la prolifération des LT et la sécrétion de cytokines.

Par la suite, nous avons évalué les mécanismes précoces impliqués dans la reconnaissance des agrégats en tant que signal de danger par les moDC. Les récepteurs au fragment Fc des IgG (Fc γ R) font partie des récepteurs pouvant induire l'activation des DC et sont des candidats potentiels pour la reconnaissance d'agrégats d'anticorps. Il existe plusieurs types de Fc γ R qui diffèrent entre eux selon leur affinité aux IgG et leur expression sur les cellules immunitaires. Le Fc γ RIIa (activateur), le Fc γ RIIb (inhibiteur) et le Fc γ RIII (activateur) possèdent une affinité

élevée aux complexes immuns et aux agrégats d'IgG. De plus, les FcγRIIa et FcγRIIb sont les plus exprimés parmi les FcγR sur les DC et les moDC différenciées *in vitro* (Bournazos et al., 2016; Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Ainsi, nous avons focalisé notre étude sur la voie du FcγRIIa et de la tyrosine kinase Syk qui est activée suite à l'engagement des FcγR activateurs. D'abord, en utilisant un anticorps bloquant spécifique du FcγRIIa, nous avons montré que ce récepteur était impliqué et nécessaire à l'activation des moDC induite par les agrégats d'infliximab. En effet, la neutralisation du FcγRIIa a conduit à la diminution de l'expression des marqueurs de surface des moDC ainsi que de la production des cytokines et chimiokines inflammatoires. La fixation des agrégats au FcγRIIa suppose la phosphorylation sous-jacente de Syk, qui à son tour induit l'activation de différentes voies de signalisation nécessaires aux différentes fonctions des DC : expression des marqueurs de surface, production de cytokines et chimiokines et internalisation des antigènes et leur présentation (Rosales and Uribe-Querol, 2017). Nous avons tout d'abord confirmé l'augmentation précoce de la phosphorylation de Syk induite par les agrégats d'infliximab. Par la suite, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique spécifique de Syk et nous avons ainsi montré que cette kinase est impliquée dans l'activation des moDC et des LT CD4⁺. D'une part, l'inhibition de Syk a induit l'abolition de l'expression des marqueurs de surface des moDC et de la production des cytokines et chimiokines inflammatoires en réponse aux agrégats d'infliximab. D'autre part, nous avons pu montrer que cette inhibition aboutissait à la réduction de la prolifération des LT et de la sécrétion des cytokines, indiquant que l'activation des moDC via Syk est indispensable pour l'obtention d'une réponse T aux agrégats d'infliximab. Il est important de noter que selon la nature des agrégats, différentes voies de reconnaissance et de signalisation peuvent être engagées. Ainsi, la neutralisation des FcγR et des TLR 2 et 4 dans les PBMC humaines par Joubert et collaborateurs a permis de mettre en évidence l'implication de ces récepteurs dans l'activation des PBMC, notamment les TLR et les FcγRI et FcγRIII (Joubert et al., 2012). Ces

deux derniers sont largement exprimés à la surface des monocytes, toutefois leur expression est nettement diminuée lors de la différenciation *in vitro* des monocytes en moDC (Boruchov et al., 2005). La divergence observée dans les résultats est donc probablement due à l'expression différentielle des FcγR à la surface des cellules immunitaires. Par ailleurs, dans un travail complémentaire (Annexe I), nous avons montré que les agrégats de GH, produits par stress d'agitation, induisaient la phosphorylation de p38 MAPK, ERK, JNK et NF-κB (Nabhan et al., 2019). L'étude de voies de signalisation précoces nous a permis de montrer que les protéines intracellulaires Rac1 et PI3K étaient impliquées dans la phosphorylation des MAP kinases ainsi que dans la production de la chimiokine CXCL10 (Nabhan et al., 2019). La phosphorylation de p38 MAPK, ERK et JNK a également été induite dans les PBMC en réponse à des agrégats d'immunoglobuline intraveineuse (IVIG) et des agrégats de bévacizumab (Avastin) produits suite à un stress d'agitation (Polumuri et al., 2018). Quant aux agrégats d'infliximab testés au cours de l'étude ABIRISK (Annexe II), ils induisaient la phosphorylation de Syk, ERK et Akt et n'avaient pas d'effet sur JNK et p38 MAPK (Morgan et al., 2019). Tous ces résultats montrent la diversité des voies de signalisation induites par les agrégats de protéines.

Au total, les résultats de cette première partie du travail ont donc permis de montrer d'une manière claire que les agrégats d'infliximab, jouant le rôle de signal de danger, induisaient la maturation des moDC et l'activation des LT CD4⁺ via la voie FcγRIIa-Syk (figure 32).

Toutefois, il est important de noter que les stress « exagérés » employés dans les différentes études citées ci-dessus induisent la formation d'agrégats de tailles variées allant à plus de 100 μm. La présence de gros agrégats, pouvant avoir une taille supérieure à celle des cellules, nous laisse penser que plusieurs récepteurs peuvent être engagés à la fois à la surface d'une même cellule. Les récepteurs, identiques ou différents, peuvent induire à leur tour l'activation de plusieurs voies de signalisation responsables des modifications phénotypiques des cellules immunitaires. Ainsi, la diversité de la réponse observée dans ces différentes études permet de

mettre en évidence un comportement différent des cellules immunitaires en fonction de la nature des agrégats employés. Cependant, notre modèle d'étude montre ses limites avec l'utilisation de préparations comportant des agrégats de grosses tailles avec lesquels on a l'impression que les moDC sont « sur-activées ».

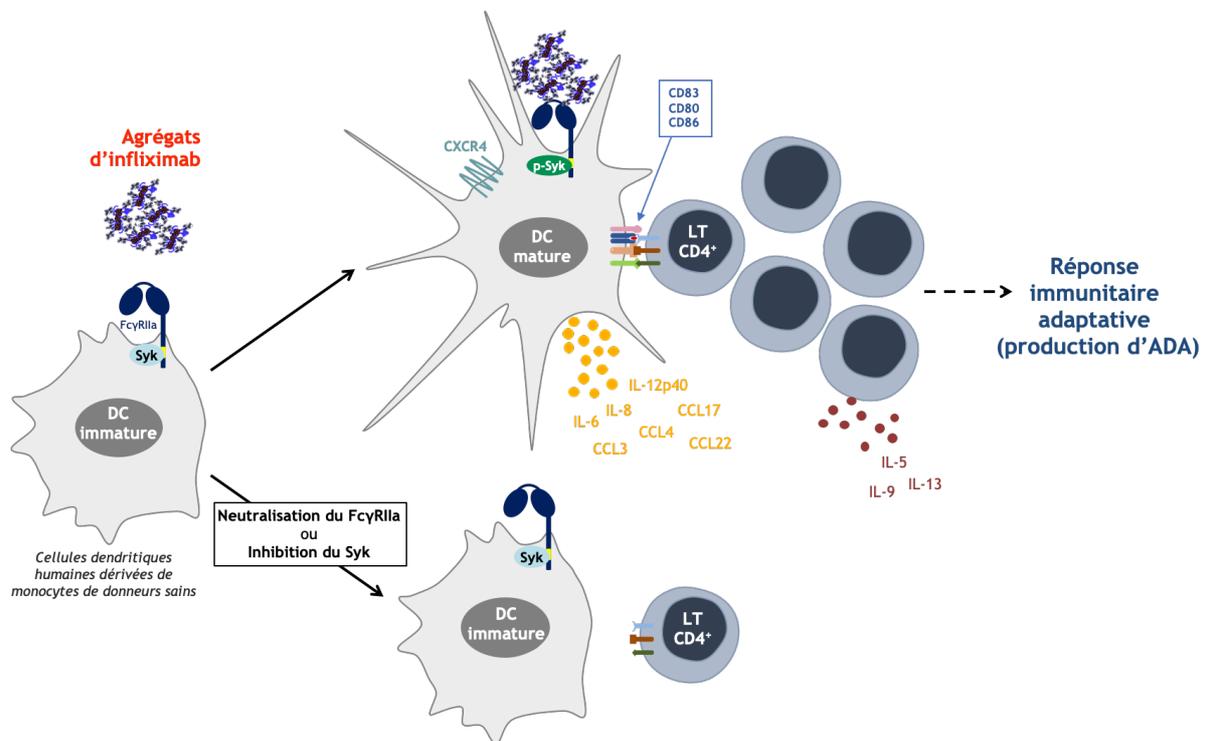


Figure 32 : Mécanismes impliqués dans l'activation des cellules dendritiques humaines et des lymphocytes T CD4⁺ par les agrégats d'infliximab.

2. Rôle de l'agrégation de l'infliximab dans la génération de nouveaux épitopes de l'infliximab

Les DC sont des cellules sentinelles du système immunitaire. Elles ont la capacité de détecter les signaux de danger, capturer les antigènes et les présenter aux LT afin de déclencher une réponse immunitaire adaptative spécifique. Nous avons préalablement mis en évidence le rôle de signal de danger des agrégats d'infliximab. Dans cette deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés au rôle de l'agrégation dans l'altération des mécanismes d'apprêtement et de présentation de peptides aux LT CD4⁺ pour potentiellement favoriser l'activation spécifique de ces cellules.

Pour cela, nous avons préparé des agrégats en soumettant l'inflximab concentré à 1 mg.mL^{-1} à 2 types et plusieurs temps de stress. D'une part, un stress thermique (HS) a permis de produire des agrégats de taille micrométrique dont 75 % ayant une taille inférieure à $11,5 \mu\text{m}$ (stress de 1 à 6 heures). D'autre part, un stress de lumière (UV) a permis d'induire uniquement la formation de dimères et d'oligomères solubles. Pour les 2 types de stress, la quantité d'agrégats formés augmentait avec le temps de stress induit. Le choix de l'utilisation de ces stress dans cette partie de l'étude était basé sur la nécessité de se rapprocher au mieux des tailles d'agrégats pouvant être détectés dans les préparations injectables, notamment celles des oligomères solubles dont l'effet est évalué pour la première fois dans un modèle *in vitro*. Les études évaluant l'immunogénicité des agrégats ont pour la plupart employé des stress artificiels exagérés qui aboutissaient à la formation de quantités élevées d'agrégats hétérogènes de toutes les tailles et de toutes les formes (Moussa et al., 2016a). De ce fait, les résultats obtenus à l'issue de ces études peuvent être contradictoires voire controversés. Par exemple, Fathallah et collaborateurs ont montré que les oligomères solubles ($< 100 \text{ nm}$) sont les plus immunogènes (Fathallah et al., 2015) alors que Kijanka et collaborateurs ont suggéré que les agrégats d'anticorps submicrométriques ($100 - 1000 \text{ nm}$) sont plus immunogènes que les oligomères solubles et les agrégats micrométriques ($1 - 100 \mu\text{m}$) (Kijanka et al., 2018) lorsqu'ils sont injectés chez la souris. Enfin, une étude *in vitro* a montré que les agrégats d'anticorps de taille entre 5 et $10 \mu\text{m}$ induisaient une sécrétion de cytokines par les PBMC plus importante, comparée à d'autres tailles d'agrégats (Telikepalli et al., 2015).

2.1. Cas des agrégats de taille micrométrique

Dans le cas des agrégats HS, nous avons commencé par évaluer l'activation des moDC. Nous avons montré que les agrégats d'inflximab produits sous 1 et 2 heures de stress thermique (HS1 et HS2) n'induisaient pas d'augmentation significative de l'expression des marqueurs de

surface CD83, CD86 et PD-L1. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus pour des agrégats de rituximab et de trastuzumab constituant moins de 3 % des préparations, où les agrégats de rituximab n'induisaient pas de modification de l'expression des marqueurs de surface, alors que les agrégats de trastuzumab induisaient une légère augmentation du CD86 et de l'HLA-DR (Ahmadi et al., 2015). Ceci suggère que de faibles quantités d'agrégats n'entraînent pas une activation détectable des moDC. Les agrégats HS sous 3, 4, 6 et 24 heures de stress induisaient une augmentation progressive de l'expression de ces marqueurs, indiquant que l'activation des moDC est augmentée avec la quantité d'agrégats dans les préparations. Toutefois il reste à confirmer si cette activation est due à l'augmentation de la quantité d'agrégats de taille supérieure à 10 μm ou à celle de l'ensemble des agrégats observées avec l'augmentation de la durée du stress. La préparation d'agrégats de tailles et de quantités bien définies permettrait de mieux répondre à ces hypothèses.

Par ailleurs, nous avons montré que les agrégats d'inflximab HS1 et HS24 marqués à l'Alexa Fluor 488 pouvaient être internalisés par les moDC, et que cette internalisation augmentait avec le temps. Ahmadi et collaborateurs ont également montré que les agrégats de rituximab marqués étaient internalisés par les moDC et co-localisés avec les molécules HLA-DR après 30 min d'incubation (Ahmadi et al., 2015). L'internalisation des agrégats d'anticorps et leur co-localisation avec les molécules du CMH de classe II indiquent qu'ils peuvent être apprêtés pour ensuite être présentés sous forme de peptides aux LT CD4⁺.

Enfin, nous avons utilisé un modèle de co-cultures autologues de moDC et de LT CD4⁺ naïfs issus de donneurs sains pour évaluer la fréquence de LT spécifiques des agrégats d'inflximab. Nous avons choisi de comparer l'effet de l'inflximab natif à celui de l'inflximab agrégé HS1 afin d'éviter au mieux l'effet signal de danger des agrégats et se focaliser sur leur rôle dans la modification des épitopes présentés aux LT. Les résultats obtenus chez 5 donneurs sains ont d'abord permis de déterminer une fréquence de 0,31 LT CD4⁺ naïf reconnaissant l'inflximab

natif par million de LT CD4⁺ naïfs circulants. Une étude de Delluc et collaborateurs avait permis de calculer une fréquence de 0,1 LT CD4⁺ spécifiques de l'infliximab natif par million de LT CD4⁺ totaux (Delluc et al., 2011). Étant donné le petit nombre de donneurs testés dans notre étude, cette différence traduit probablement la variabilité inter-individuelle. Ces fréquences sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour d'autres protéines thérapeutiques immunogènes tels que le rituximab, l'adalimumab et l'érythropoïétine recombinante humaine (fréquences respectives de 0,35, 0,33 et 0,53 LT spécifique par million de LT CD4⁺ totaux circulants) (Delluc et al., 2010, 2011). D'autres anticorps thérapeutiques moins immunogènes comme le trastuzumab et l'etanercept présentent des fréquences plus faibles (respectivement 0,02 et 0,01 LT spécifique par million de LT CD4⁺ totaux circulants) (Delluc et al., 2011). Par ailleurs, nous avons déterminé une fréquence de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant les agrégats d'infliximab HS1 qui était 2,6 fois plus élevée que celle des LT reconnaissant l'infliximab natif. Ceci indique que la quantité et/ou la variété des épitopes présentés et reconnus par des LT spécifiques seraient plus importantes en présence d'agrégats qu'en présence de l'anticorps natif. Ce résultat est en accord avec l'étude de Rombach-Riegraf et collaborateurs qui montre par la technique du MAPPs une augmentation du nombre de peptides présentés par des moDC incubées avec des agrégats d'anticorps par rapport à celles incubées avec l'anticorps natif. Les auteurs suggèrent que l'internalisation d'un agrégat d'anticorps de taille micrométrique par les CPA induirait une augmentation de la concentration protéique dans les endolysosomes, ce qui favoriserait l'obtention de peptides en quantités plus importantes (Rombach-Riegraf et al., 2014). Par ailleurs, nous avons évalué la réactivité croisée des LT d'une part reconnaissant l'infliximab natif et d'autre part l'infliximab agrégé HS1. Dans un premier temps, nous avons montré que, sauf exception, les LT spécifiques de l'infliximab natif pouvaient également reconnaître les agrégats HS1. Ceci s'explique par le fait que dans cette préparation d'agrégats, il subsiste 90 % de monomères qui

sont potentiellement inducteurs de la réponse T observée. Dans un deuxième temps, nous avons montré que dans le cas des LT spécifiques des agrégats d'infliximab HS1, il existait des LT qui ne reconnaissaient que des motifs issus des agrégats alors que d'autres reconnaissaient des motifs communs à l'infliximab natif et agrégé. Une explication à ce résultat est que les modifications conformationnelles (dénaturation, dépliement et repliement) que peut subir un anticorps lorsqu'il est soumis à un stress pourraient favoriser l'exposition d'épitopes immunodominants (Rombach-Riegraf et al., 2014). Ainsi, l'agrégation induirait l'apparition de néo-épitopes qui expliquerait la spécificité de la réponse observée avec les agrégats d'infliximab HS1.

2.2. Cas des oligomères solubles

Dans le cas des oligomères solubles, les agrégats ont été produits suite à la soumission de l'infliximab à un stress de lumière UV. La caractérisation de ces agrégats a été faite par SEC qui nous a permis de distinguer les populations de monomères, de dimères et d'oligomères solubles. Il est prévu de compléter cette caractérisation par MFI et par DLS pour confirmer l'absence d'agrégats submicrométriques et micrométriques. Par ailleurs, il serait intéressant de savoir si l'obtention de ces oligomères a favorisé la formation de liaisons covalentes, ce qui renforcerait la notion d'irréversibilité. Cette question peut dans un premier temps être facilement adressée par la réalisation d'électrophorèses en conditions natives versus des conditions dénaturantes et réductrices.

Des co-cultures autologues ont été réalisées chez 3 donneurs sains pour comparer les fréquences de LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'infliximab natif et des oligomères solubles d'infliximab issus de 20 heures de stress de lumière UV. Les résultats obtenus ont permis de déterminer une fréquence de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant les agrégats d'infliximab UV plus élevée que celle des LT reconnaissant l'infliximab natif. Cette différence de fréquences suggère qu'en présence

de dimères et d'oligomères solubles, la quantité de peptides présentés serait plus importante qu'avec l'inflximab natif. Toutefois, en considérant donneur par donneur, le nombre de puits positifs contenant des LT reconnaissant l'inflximab natif ou agrégé, nous pouvons noter que cette différence reste assez faible. Ainsi, il s'avère nécessaire de confirmer ces résultats chez d'autres donneurs. Il serait également intéressant d'augmenter les concentrations d'anticorps et d'agrégats utilisées dans la stimulation des moDC afin de confirmer cette différence entre les fréquences de LT spécifiques des monomères et des oligomères. Ensuite, en évaluant la réactivité croisée des LT, nous avons montré que, comme pour les agrégats d'inflximab HS1, les LT spécifiques de l'inflximab natif pouvaient également reconnaître les agrégats UV. Ceci serait également dû à la conservation d'une population de monomères dans les préparations agrégées. D'autre part, nous avons montré que dans le cas des LT spécifiques de l'inflximab agrégé UV, il existait des LT qui reconnaissaient l'inflximab natif alors que d'autres ne reconnaissaient que des motifs dérivant des agrégats. Comme pour les agrégats HS1, la dimérisation et l'oligomérisation de l'inflximab pourraient induire l'apparition de néo-épitopes expliquant la spécificité de la réponse observée avec les agrégats d'inflximab UV.

Dans la suite de cette étude, il semble nécessaire d'étudier l'effet des agrégats sur les moDC afin de vérifier leur rôle de signal de danger. En effet, il n'existe dans la littérature que deux études qui évaluent l'immunogénicité directe des dimères et des oligomères et ceci dans des modèles murins. D'une part, Fathallah et collaborateurs montrent que les oligomères de taille inférieure à 100 nm étaient les plus immunogènes par rapport au monomère et aux agrégats micrométriques (Fathallah et al., 2015). Par contre, Kijanka et collaborateurs affirment que des dimères d'un anticorps monoclonal produits par diminution de pH à 2,5, ou température élevée ou stress de lumière UV, ne sont pas immunogènes et n'induisaient pas une production d'ADA plus importante que l'anticorps natif chez la souris (Kijanka et al., 2019).

En somme, cette étude permet de suggérer que la présence d'agrégats dans les préparations d'anticorps induirait des modifications dans la présentation de peptides par les DC aux LT. Les altérations dans les mécanismes d'apprêtement et de présentation des peptides concerneraient les quantités de peptides présentés ainsi que leur diversité avec l'apparition de néo-épitopes qui favoriseraient l'activation de nouveaux LT naïfs.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail a permis en premier lieu la détermination d'événements clés dans la réponse cellulaire aux agrégats d'anticorps. Nous avons d'abord confirmé le rôle des agrégats d'inflximab en tant que signal de danger détecté par les DC et induisant une réponse lymphocytaire. Nous avons montré par la suite et pour la première fois l'implication de la voie Syk via FcγRIIa dans l'activation des moDC par les agrégats d'inflximab et dans la prolifération des LT CD4⁺ et la sécrétion de cytokines. Cependant, une des premières études *in vitro* évaluant l'effet des agrégats d'anticorps thérapeutiques sur la réponse immunitaire a montré l'implication d'autres récepteurs, tels que FcγRI et du FcγRIII ainsi que les TLR2 et TLR4 dans l'activation des PBMC (Joubert et al., 2012). L'expression de ces différents récepteurs n'est pas identique entre les cellules circulantes, notamment entre les moDC et les monocytes. Par ailleurs, la diminution d'expression du FcγRI et du FcγRIII lors de la différenciation *in vitro* des monocytes en moDC (Boruchov et al., 2005) pourrait expliquer le rôle prépondérant du FcγRIIa dans l'activation des moDC que nous avons décrit. Toutefois, il paraît vraisemblable que l'activation des moDC et des LT soit dépendante de plusieurs types de récepteurs. Il serait donc judicieux d'étudier l'implication d'autres récepteurs exprimés sur les moDC, tels que les TLR, ou le récepteur scavenger CD36 qui peut reconnaître des structures « amyloïd-like » pouvant être présentées par les protéines agrégées (Maas et al., 2007). Leur engagement suggérerait l'activation de nouvelles voies de signalisation qui pourraient participer à l'expression des marqueurs de surface des moDC, à la sécrétion de cytokines et chimiokines et à l'internalisation des agrégats d'anticorps.

Par ailleurs, l'effet des agrégats de protéines selon leur taille est notamment étudié dans des modèles *in vivo* (Fathallah et al., 2015; Kijanka et al., 2018; Telikepalli et al., 2015). Il serait donc intéressant de séparer les agrégats protéiques selon leur taille pour ensuite comparer l'effet de chaque population sur la réponse immunitaire en utilisant les modèles d'activation des

moDC et de co-culture allogénique. La séparation des agrégats pourrait par exemple se faire par cytométrie en flux (Telikepalli et al., 2015).

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons utilisé deux types de stress (thermique et UV) qui nous ont permis de produire respectivement des agrégats de taille micrométrique et des oligomères solubles. Ces modèles d'agrégats ont été choisis afin de se rapprocher des conditions réelles des préparations injectables de biomédicaments (Nejadnik et al., 2018; Pardeshi et al., 2017).

Il a précédemment été montré que les agrégats de rituximab pouvaient être internalisés par les moDC, et dirigés vers les compartiments endosomaux (Ahmadi et al., 2015). Nous avons montré dans une expérience préliminaire que les agrégats d'infliximab (HS1) étaient internalisés par les moDC. Il serait actuellement pertinent de déterminer le mécanisme exact d'internalisation de ces agrégats, parmi les mécanismes possibles : l'endocytose pour les agrégats de taille inférieure à 0,1 μm , la macropinocytose pour les agrégats de taille entre 0,2 et 5 μm ou la phagocytose pour les agrégats de taille supérieure à 0,5 μm (Freeman and Grinstein, 2014; Liu and Roche, 2015). Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que les agrégats HS1 seraient capturés par macropinocytose ou phagocytose alors que les oligomères solubles par endocytose médiée par un récepteur. Il est possible d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques de l'internalisation afin de déterminer le mécanisme de capture des agrégats, comme par exemple la chlorpromazine pour inhiber l'endocytose médiée par la clathrine ou la cytochalasine D pour inhiber la phagocytose et la macropinocytose (Couceiro et al., 2015).

Dans la suite de ce travail, nous avons évalué le rôle des agrégats d'infliximab dans la génération de néo-épitopes, en utilisant un modèle de co-culture autologue de moDC et de LT CD4⁺ naïfs. Nous avons pu mettre en évidence l'existence de LT CD4⁺ naïfs reconnaissant spécifiquement les agrégats d'infliximab chez le sujet sain. De plus, nous avons montré que la

fréquence de LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'infliximab agrégé était supérieure à celle déterminée pour l'infliximab natif. Ce résultat suggère que la présence d'agrégats dans une préparation de biomédicament augmenterait la probabilité d'activation de LT spécifiques préexistants. De plus, l'agrégation induirait des modifications dans les mécanismes d'apprêtement et de présentation des peptides aux LT dans le sens d'une augmentation de la quantité et de la diversité des peptides présentés. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour déterminer les mécanismes intracellulaires impliqués dans la génération des peptides issus des agrégats. Il serait aussi intéressant de mettre au point un modèle de co-culture autologue qui nous permettrait de déterminer la polarisation des LT spécifiques des agrégats d'anticorps et la comparer à celle des LT spécifiques de l'anticorps natif. Enfin, nous souhaitons au sein du projet « Immunogenicity of therapeutic antibodies: from aggregation to patient monitoring », financé par le Labex LERMIT, extrapoler notre modèle de co-culture autologue à d'autres anticorps thérapeutiques d'isotypes différents tels que l'ipilimumab (IgG1) et le nivolumab (IgG4), utilisés dans le domaine de la cancérologie. Cette étude nous permettrait de comparer les types d'agrégats obtenus pour chaque anticorps et les fréquences de LT CD4⁺ spécifiques obtenues pour ces agrégats.

De manière plus générale, il a préalablement été montré que la majorité des régions hydrophobes favorables à l'agrégation (APR) de protéines sont comprises dans les séquences des épitopes T immunodominants (Kumar et al., 2012). Il est donc primordial de prédire ces épitopes en amont du développement d'un anticorps thérapeutique afin d'éviter son agrégation et réduire son immunogénicité intrinsèque. Par ailleurs, il est important de développer des méthodes de caractérisation des agrégats, notamment pour les agrégats de taille inférieure à 200 nm qui ne peuvent pas être éliminés par filtration afin de pouvoir les détecter en milieu hospitalier.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Agarkhed, M., O'Dell, C., Hsieh, M.-C., Zhang, J., Goldstein, J., and Srivastava, A. (2012). Effect of Polysorbate 80 Concentration on Thermal and Photostability of a Monoclonal Antibody. *AAPS PharmSciTech* 14, 1–9.
- Agarkhed, M., O'Dell, C., Hsieh, M.-C., Zhang, J., Goldstein, J., and Srivastava, A. (2018). Effect of Surfactants on Mechanical, Thermal, and Photostability of a Monoclonal Antibody. *AAPS PharmSciTech* 19, 79–92.
- Agrawal, S., Statkevich, P., Bajaj, G., Feng, Y., Saeger, S., Desai, D.D., Park, J.-S., Waxman, I.M., Roy, A., and Gupta, M. (2017). Evaluation of Immunogenicity of Nivolumab Monotherapy and Its Clinical Relevance in Patients With Metastatic Solid Tumors. *J. Clin. Pharmacol.* 57, 394–400.
- Ahmadi, M., Bryson, C.J., Cloake, E.A., Welch, K., Filipe, V., Romeijn, S., Hawe, A., Jiskoot, W., Baker, M.P., and Fogg, M.H. (2015). Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics. *Pharm. Res.* 32, 1383–1394.
- l'Ami, M.J., Kneepkens, E.L., Nurmohamed, M.T., Krieckaert, C.L.M., Visman, I.M., and Wolbink, G.-J. (2017). Long-term treatment response in rheumatoid arthritis patients starting adalimumab or etanercept with or without concomitant methotrexate. *Clin. Exp. Rheumatol.* 35, 431–437.
- Arango Duque, G., and Descoteaux, A. (2014). Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front. Immunol.* 5.
- 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.
- Arvinte, T., Palais, C., Green-Trexler, E., Gregory, S., Mach, H., Narasimhan, C., and Shameem, M. (2013). Aggregation of biopharmaceuticals in human plasma and human serum. *MAbs* 5, 491–500.

B

- Bachelet, D., Hässler, S., Mbogning, C., Link, J., Ryner, M., Ramanujam, R., Auer, M., Hyldgaard Jensen, P.E., Koch-Henriksen, N., Warnke, C., et al. (2016). Occurrence of Anti-Drug Antibodies against Interferon-Beta and Natalizumab in Multiple Sclerosis: A Collaborative Cohort Analysis. *PLoS ONE* 11.
- Bartelds, G.M., Wijbrandts, C.A., Nurmohamed, M.T., Stapel, S., Lems, W.F., Aarden, L., Dijkmans, B.A.C., Tak, P.P., and Wolbink, G.J. (2007). Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 921–926.
- Bartelds, G.M., Wijbrandts, C.A., Nurmohamed, M.T., Wolbink, G.J., Vries, N. de, Tak, P.P., Dijkmans, B. a. C., Crusius, J.B.A., and Horst-Bruinsma, I.E. van der (2009). Anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms. *Arthritis Rheum.* 60, 2541–2542.

- Bartelds, G.M., Krieckaert, C.L.M., Nurmohamed, M.T., van Schouwenburg, P.A., Lems, W.F., Twisk, J.W.R., Dijkmans, B.A.C., Aarden, L., and Wolbink, G.J. (2011). Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* 305, 1460–1468.
- Bastida, C., Ruíz, V., Pascal, M., Yagüe, J., Sanmartí, R., and Soy, D. (2017). Is there potential for therapeutic drug monitoring of biologic agents in rheumatoid arthritis? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83, 962–975.
- Beeg, M., Nobili, A., Orsini, B., Rogai, F., Gilardi, D., Fiorino, G., Danese, S., Salmona, M., Garattini, S., and Gobbi, M. (2019). A Surface Plasmon Resonance-based assay to measure serum concentrations of therapeutic antibodies and anti-drug antibodies. *Sci. Rep.* 9.
- Bendtsen, K. (2013). Personalized Medicine: Theranostics (Therapeutics Diagnostics) Essential for Rational Use of Tumor Necrosis Factor-alpha Antagonists. *Discov. Med.* 15, 201–211.
- Bendtsen, K. (2015). Immunogenicity of Anti-TNF- α Biotherapies: II. Clinical Relevance of Methods Used for Anti-Drug Antibody Detection. *Front. Immunol.* 6.
- Ben-Horin, S., Waterman, M., Kopylov, U., Yavzori, M., Picard, O., Fudim, E., Awadie, H., Weiss, B., and Chowers, Y. (2013). Addition of an immunomodulator to infliximab therapy eliminates antidrug antibodies in serum and restores clinical response of patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 11, 444–447.
- Bennett, C.L., Luminari, S., Nissenson, A.R., Tallman, M.S., Klinge, S.A., McWilliams, N., McKoy, J.M., Kim, B., Lyons, E.A., Trifilio, S.M., et al. (2004). Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N. Engl. J. Med.* 351, 1403–1408.
- Benucci, M., Damiani, A., Li Gobbi, F., Bandinelli, F., Infantino, M., Grossi, V., Manfredi, M., Noguier, G., and Meacci, F. (2018). Correlation between HLA haplotypes and the development of antidrug antibodies in a cohort of patients with rheumatic diseases. *Biol. Targets Ther.* 12, 37–41.
- Berkhout, L.C., Vogelzang, E.H., Hart, M.M., Loeff, F.C., Dijk, L., Derksen, N.I.L., Wieringa, R., van Leeuwen, W.A., Krieckaert, C.L.M., de Vries, A., et al. (2019). The effect of certolizumab drug concentration and anti-drug antibodies on TNF neutralisation. *Clin. Exp. Rheumatol.*
- Bessa, J., Boeckle, S., Beck, H., Buckel, T., Schlicht, S., Ebeling, M., Kiialainen, A., Koulov, A., Boll, B., Weiser, T., et al. (2015). The immunogenicity of antibody aggregates in a novel transgenic mouse model. *Pharm. Res.* 32, 2344–2359.
- Billiet, T., Castele, N.V., Stappen, T.V., Princen, F., Singh, S., Gils, A., Ferrante, M., Assche, G.V., Cleynen, I., and Vermeire, S. (2015). Immunogenicity to infliximab is associated with HLA-DRB1. *Gut* 64, 1344–1345.
- Biram, A., Davidzohn, N., and Shulman, Z. (2019). T cell interactions with B cells during germinal center formation, a three-step model. *Immunol. Rev.* 288, 37–48.
- Bitoun, S., Nocturne, G., Ly, B., Krzysiek, R., Roques, P., Pruvost, A., Paoletti, A., Pascaud, J., Dönnès, P., Florence, K., et al. (2018). Methotrexate and BAFF interaction prevents immunization against TNF inhibitors. *Ann. Rheum. Dis.* 77, 1463–1470.

- Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V., and Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* *19*, 41–52.
- Bloem, K., van Leeuwen, A., Verbeek, G., Nurmohamed, M.T., Wolbink, G.J., van der Kleij, D., and Rispens, T. (2015). Systematic comparison of drug-tolerant assays for anti-drug antibodies in a cohort of adalimumab-treated rheumatoid arthritis patients. *J. Immunol. Methods* *418*, 29–38.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 443–473.
- Boll, B., Bessa, J., Folzer, E., Ríos Quiroz, A., Schmidt, R., Bulau, P., Finkler, C., Mahler, H.-C., Huwyler, J., Iglesias, A., et al. (2017). Extensive Chemical Modifications in the Primary Protein Structure of IgG1 Subvisible Particles Are Necessary for Breaking Immune Tolerance. *Mol. Pharm.* *14*, 1292–1299.
- Bommana, R., Chai, Q., Schöneich, C., Weiss, W.F., and Majumdar, R. (2018). Understanding the Increased Aggregation Propensity of a Light-Exposed IgG1 Monoclonal Antibody Using Hydrogen Exchange Mass Spectrometry, Biophysical Characterization, and Structural Analysis. *J. Pharm. Sci.* *107*, 1498–1511.
- Boruchov, A.M., Heller, G., Veri, M.-C., Bonvini, E., Ravetch, J.V., and Young, J.W. (2005). Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest.* *115*, 2914–2923.
- Bournazos, S., Wang, T.T., and Ravetch, J.V. (2016). The Role and Function of Fcγ Receptors on Myeloid Cells. *Microbiol. Spectr.* *4*.
- Boven, K., Stryker, S., Knight, J., Thomas, A., van Regenmortel, M., Kemeny, D.M., Power, D., Rossert, J., and Casadevall, N. (2005). The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes. *Kidney Int.* *67*, 2346–2353.
- Brennan, P.J., Rodriguez Bouza, T., Hsu, F.I., Sloane, D.E., and Castells, M.C. (2009). Hypersensitivity reactions to mAbs: 105 desensitizations in 23 patients, from evaluation to treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* *124*, 1259–1266.
- van Brummelen, E.M.J., Ros, W., Wolbink, G., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H.M. (2016). Antidrug Antibody Formation in Oncology: Clinical Relevance and Challenges. *The Oncologist* *21*, 1260–1268.

C

- 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.
- Cassotta, A., Mikol, V., Bertrand, T., Pouzieux, S., Parc, J.L., Ferrari, P., Dumas, J., Auer, M., Deisenhammer, F., Gastaldi, M., et al. (2019). A single T cell epitope drives the neutralizing anti-drug antibody response to natalizumab in multiple sclerosis patients. *Nat. Med.* *25*, 1402–1407.

- Chaigne, B., and Watier, H. (2015). Monoclonal antibodies in excess: A simple way to avoid immunogenicity in patients? *J. Allergy Clin. Immunol.* *136*, 814–816.
- Chalmin, F., Humblin, E., Ghiringhelli, F., and Végran, F. (2018). Transcriptional Programs Underlying Cd4 T Cell Differentiation and Functions. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *341*, 1–61.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., and Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* *157*, 220–233.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 227–242.
- Chennamsetty, N., Voynov, V., Kayser, V., Helk, B., and Trout, B.L. (2009). Design of therapeutic proteins with enhanced stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 11937–11942.
- Choquette, D., Faraawi, R., Chow, A., Rodrigues, J., Bensen, W.J., and Nantel, F. (2015). Incidence and Management of Infusion Reactions to Infliximab in a Prospective Real-world Community Registry. *J. Rheumatol.* *42*, 1105–1111.
- Chung, C.H., Mirakhur, B., Chan, E., Le, Q.-T., Berlin, J., Morse, M., Murphy, B.A., Satinover, S.M., Hosen, J., Mauro, D., et al. (2008). Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- α -1,3-Galactose. *N. Engl. J. Med.* *358*, 1109–1117.
- Cludts, I., Spinelli, F.R., Morello, F., Hockley, J., Valesini, G., and Wadhwa, M. (2017). Anti-therapeutic antibodies and their clinical impact in patients treated with the TNF antagonist adalimumab. *Cytokine* *96*, 16–23.
- Collin, M., and Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology* *154*, 3–20.
- Commins, S.P., James, H.R., Kelly, L.A., Pochan, S.L., Workman, L.J., Perzanowski, M.S., Kocan, K.M., Fahy, J.V., Nganga, L.W., Ronmark, E., et al. (2011). The relevance of tick bites to the production of IgE antibodies to the mammalian oligosaccharide galactose- α -1,3-galactose. *J. Allergy Clin. Immunol.* *127*, 1286-1293.e6.
- Couceiro, J.R., Gallardo, R., De Smet, F., De Baets, G., Baatsen, P., Annaert, W., Roose, K., Saelens, X., Schymkowitz, J., and Rousseau, F. (2015). Sequence-dependent Internalization of Aggregating Peptides. *J. Biol. Chem.* *290*, 242–258.
- Cromwell, M.E.M., Hilario, E., and Jacobson, F. (2006). Protein aggregation and bioprocessing. *AAPS J.* *8*, E572–E579.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621–663.

D

- Daëron, M. (1997). Fc RECEPTOR BIOLOGY. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 203–234.
- Davda, J., Declerck, P., Hu-Lieskovan, S., Hickling, T.P., Jacobs, I.A., Chou, J., Salek-Ardakani, S., and Kraynov, E. (2019). Immunogenicity of immunomodulatory, antibody-based, oncology therapeutics. *J. Immunother. Cancer* *7*.
- Davies, A., Merli, F., Mihaljević, B., Mercadal, S., Siritanaratkul, N., Solal-Céligny, P., Boehnke, A., Berge, C., Genevray, M., Zharkov, A., et al. (2017). Efficacy and safety of

- subcutaneous rituximab versus intravenous rituximab for first-line treatment of follicular lymphoma (SABRINA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* *4*, e272–e282.
- Deckert, T. (1985). The immunogenicity of new insulins. *Diabetes* *34 Suppl 2*, 94–96.
- Delignat, S., Rayes, J., Russick, J., Kaveri, S.V., Lacroix-Desmazes, S., and ABIRISK consortium (2018). Inhibitor Formation in Congenital Hemophilia A: an Immunological Perspective. *Semin. Thromb. Hemost.* *44*, 517–530.
- Delluc, S., Ravot, G., and Maillere, B. (2010). Quantification of the preexisting CD4 T-cell repertoire specific for human erythropoietin reveals its immunogenicity potential. *Blood* *116*, 4542–4545.
- Delluc, S., Ravot, G., and Maillere, B. (2011). Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors. *FASEB J.*
- Dénarié, D., Rinaudo-Gaujous, M., Thomas, T., Paul, S., and Marotte, H. (2017). Methotrexate Reduced TNF Bioactivity in Rheumatoid Arthritis Patients Treated with Infliximab. *Mediators Inflamm.* *2017*.
- Dingman, R., and Balu-Iyer, S.V. (2019). Immunogenicity of Protein Pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* *108*, 1637–1654.
- Doevendans, E., and Schellekens, H. (2019). Immunogenicity of Innovative and Biosimilar Monoclonal Antibodies. *Antibodies* *8*, 21.
- Dreesen, E., Bossuyt, P., Mulleman, D., Gils, A., and Pascual-Salcedo, D. (2017). Practical recommendations for the use of therapeutic drug monitoring of biopharmaceuticals in inflammatory diseases. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* *9*, 101–111.
- Dunn, N., Juto, A., Ryner, M., Manouchehrinia, A., Piccoli, L., Fink, K., Piehl, F., and Fogdell-Hahn, A. (2018). Rituximab in multiple sclerosis: Frequency and clinical relevance of anti-drug antibodies. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *24*, 1224–1233.
- Dustin, M.L. (2014). The immunological synapse. *Cancer Immunol. Res.* *2*, 1023–1033.

E

- Einarsson, J.T., Evert, M., Geborek, P., Saxne, T., Lundgren, M., and Kapetanovic, M.C. (2017). Rituximab in clinical practice: dosage, drug adherence, Ig levels, infections, and drug antibodies. *Clin. Rheumatol.* *36*, 2743–2750.
- Eisenbarth, S.C. (2019). Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat. Rev. Immunol.* *19*, 89–103.
- Ellis, E.F., and Henney, C.S. (1969). Adverse reactions following administration of human gamma globulin. *J. Allergy* *43*, 45–54.
- Emery, P., Bingham, C.O., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Furst, D.E., Mariette, X., Heijde, D. van der, Vollenhoven, R. van, Arendt, C., Mountian, I., et al. (2017). Certolizumab pegol in combination with dose-optimised methotrexate in DMARD-naïve patients with early, active rheumatoid arthritis with poor prognostic factors: 1-year results from C-

- EARLY, a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Ann. Rheum. Dis.* *76*, 96–104.
- Ettinger, R.A., Liberman, J.A., Gunasekera, D., Puranik, K., James, E.A., Thompson, A.R., and Pratt, K.P. (2018). FVIII proteins with a modified immunodominant T-cell epitope exhibit reduced immunogenicity and normal FVIII activity. *Blood Adv.* *2*, 309–322.
- European Medicines Agency (2017). Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins (European Medicines Agency).
- Evens, A.M., Bennett, C.L., and Luminari, S. (2005). Epoetin-induced pure red-cell aplasia (PRCA): preliminary results from the research on adverse drug events and reports (RADAR) group. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* *18*, 481–489.
- Eyes, T.J., Austerberry, J.I., Dearman, R.J., Johannissen, L.O., Kimber, I., Smith, N., Thistlethwaite, A., and Derrick, J.P. (2019). Identification of B cell epitopes enhanced by protein unfolding and aggregation. *Mol. Immunol.* *105*, 181–189.
- F**
- Farrera, C., and Fadeel, B. (2015). It takes two to tango: Understanding the interactions between engineered nanomaterials and the immune system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *95*, 3–12.
- Fathallah, A.M., Chiang, M., Mishra, A., Kumar, S., Xue, L., Middaugh, C.R., and Balu-Iyer, S.V. (2015). The Effect of Small Oligomeric Protein Aggregates on the Immunogenicity of Intravenous and Subcutaneous Administered Antibodies. *J. Pharm. Sci.* *104*, 3691–3702.
- Faustini, F., Parodis, I., Dunn, N., Ryner, M., Fogdell-Hahn, A., and Gunnarsson, I. (2018). AB0512 Occurrence and consequences of anti-drug antibodies to rituximab in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* *77*, 1414–1415.
- Filipe, V., Kükreer, B., Hawe, A., and Jiskoot, W. (2012a). Transient molten globules and metastable aggregates induced by brief exposure of a monoclonal IgG to low pH. *J. Pharm. Sci.* *101*, 2327–2339.
- Filipe, V., Jiskoot, W., Basmeh, A.H., Halim, A., Schellekens, H., and Brinks, V. (2012b). Immunogenicity of different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice. *MAbs* *4*, 740–752.
- Filipe, V., Que, I., Carpenter, J.F., Löwik, C., and Jiskoot, W. (2013). In Vivo Fluorescence Imaging of IgG1 Aggregates After Subcutaneous and Intravenous Injection in Mice. *Pharm. Res.* *31*, 216–227.
- Fineberg, S.E., Kawabata, T.T., Finco-Kent, D., Fountaine, R.J., Finch, G.L., and Krasner, A.S. (2007). Immunological Responses to Exogenous Insulin. *Endocr. Rev.* *28*, 625–652.
- Fooksman, D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D., Waite, J., Sacristán, C., Victora, G., Zanin-Zhorov, A., and Dustin, M.L. (2010). Functional Anatomy of T Cell Activation and Synapse Formation. *Annu. Rev. Immunol.* *28*, 79–105.
- Freeman, S.A., and Grinstein, S. (2014). Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol. Rev.* *262*, 193–215.

Freiherr, P. von C., Clemens Peter (1905). *Die Serumkrankheit* (Leipzig, Wien: Franz Deuticke).

Freitag, A.J., Shomali, M., Michalakakis, S., Biel, M., Siedler, M., Kaymakcalan, Z., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., Winter, G., and Engert, J. (2014). Investigation of the Immunogenicity of Different Types of Aggregates of a Murine Monoclonal Antibody in Mice. *Pharm. Res.* 32, 430–444.

Friedman, B., and Cronstein, B. (2019). Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 86, 301–307.

G

Gallais, Y., Szely, N., Legrand, F.-X., Leroy, A., Pallardy, M., and Turbica, I. (2017). Effect of growth hormone and IgG aggregates on dendritic cells activation and T-cells polarization. *Immunol. Cell Biol.* 95, 306–315.

Gamarra, R.M., McGraw, S.D., Drelichman, V.S., and Maas, L.C. (2006). Serum sickness-like reactions in patients receiving intravenous infliximab. *J. Emerg. Med.* 30, 41–44.

Garcês, S., Demengeot, J., and Benito-Garcia, E. (2013). The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 72, 1947–1955.

Genovese, M.C., Covarrubias, A., Leon, G., Mysler, E., Keiserman, M., Valente, R., Nash, P., Simon-Campos, J.A., Porawska, W., Box, J., et al. (2011). Subcutaneous abatacept versus intravenous abatacept: a phase IIIb noninferiority study in patients with an inadequate response to methotrexate. *Arthritis Rheum.* 63, 2854–2864.

Georgiev, P., Charbonnier, L.-M., and Chatila, T.A. (2019). Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *J. Clin. Immunol.* 39, 623–640.

Gorman, S.D., and Clark, M.R. (1990). Humanisation of monoclonal antibodies for therapy. *Semin. Immunol.* 2, 457–466.

Gorovits, B., Baltrukonis, D.J., Bhattacharya, I., Birchler, M.A., Finco, D., Sikkema, D., Vincent, M.S., Lula, S., Marshall, L., and Hickling, T.P. (2018). Immunoassay methods used in clinical studies for the detection of anti-drug antibodies to adalimumab and infliximab. *Clin. Exp. Immunol.* 192, 348–365.

Goupille, P. (2016). Immunogénicité des biomédicaments : quelles conséquences au cours du traitement de la polyarthrite rhumatoïde ? *Rev. Médecine Interne* 37, 343–349.

Gouw, S.C., and van den Berg, H.M. (2009). The multifactorial etiology of inhibitor development in hemophilia: genetics and environment. *Semin. Thromb. Hemost.* 35, 723–734.

Gribben, J.G., Devereux, S., Thomas, N.S., Keim, M., Jones, H.M., Goldstone, A.H., and Linch, D.C. (1990). Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *Lancet Lond. Engl.* 335, 434–437.

Grilo, A.L., and Mantalaris, A. (2019). The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. *Trends Biotechnol.* 37, 9–16.

- Grosen, A., Julsgaard, M., and Christensen, L.A. (2013). Serum sickness-like reaction due to Infliximab reintroduction during pregnancy. *J. Crohns Colitis* 7, e191–e191.
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2014). The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 94–108.
- Gunn, G.R., Sealey, D.C.F., Jamali, F., Meibohm, B., Ghosh, S., and Shankar, G. (2016). From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals. *Clin. Exp. Immunol.* 184, 137–146.
- Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., and Williams, L.T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 258–263.

H

- Haggerty, H.G., Abbott, M.A., Reilly, T.P., DeVona, D.A., Gleason, C.R., Tay, L., Dodge, R., and Aranda, R. (2007). Evaluation of immunogenicity of the T cell costimulation modulator abatacept in patients treated for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 34, 2365–2373.
- Hamuro, L., Kijanka, G., Kinderman, F., Kropshofer, H., Bu, D.-X., Zepeda, M., and Jawa, V. (2017). Perspectives on Subcutaneous Route of Administration as an Immunogenicity Risk Factor for Therapeutic Proteins. *J. Pharm. Sci.* 106, 2946–2954.
- Hamze, M., Meunier, S., Karle, A., Gdoura, A., Goudet, A., Szely, N., Pallardy, M., Carbonnel, F., Spindeldreher, S., Mariette, X., et al. (2017). Characterization of CD4 T Cell Epitopes of Infliximab and Rituximab Identified from Healthy Donors. *Front. Immunol.* 8.
- Hanauer, S.B., Wagner, C.L., Bala, M., Mayer, L., Travers, S., Diamond, R.H., Olson, A., Bao, W., and Rutgeerts, P. (2004). Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2, 542–553.
- Harding, F.A., Stickler, M.M., Razo, J., and DuBridg, R.B. (2010). The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *MAbs* 2, 256–265.
- Hari, S.B., Lau, H., Razinkov, V.I., Chen, S., and Latypov, R.F. (2010). Acid-induced aggregation of human monoclonal IgG1 and IgG2: molecular mechanism and the effect of solution composition. *Biochemistry* 49, 9328–9338.
- Hart, M.H., de Vrieze, H., Wouters, D., Wolbink, G.-J., Killestein, J., de Groot, E.R., Aarden, L.A., and Rispen, T. (2011). Differential effect of drug interference in immunogenicity assays. *J. Immunol. Methods* 372, 196–203.
- Hawe, A., Kasper, J.C., Friess, W., and Jiskoot, W. (2009). Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 38, 79–87.
- Hendy, P., Hart, A., and Irving, P. (2016). Anti-TNF drug and antidrug antibody level monitoring in IBD: a practical guide. *Frontline Gastroenterol.* 7, 122–128.

- Henney, C.S., and Ellis, E.F. (1968). Antibody production to aggregated human gamma-Globulin in acquired hypogammaglobulinemia. *N. Engl. J. Med.* 278, 1144–1146.
- Holland, C.J., Cole, D.K., and Godkin, A. (2013). Re-Directing CD4+ T Cell Responses with the Flanking Residues of MHC Class II-Bound Peptides: The Core is Not Enough. *Front. Immunol.* 4.
- Homann, A., Röckendorf, N., Kromminga, A., Frey, A., and Jappe, U. (2015). B cell epitopes on infliximab identified by oligopeptide microarray with unprocessed patient sera. *J. Transl. Med.* 13.
- Homann, A., Röckendorf, N., Kromminga, A., Frey, A., Platts-Mills, T.A., and Jappe, U. (2017). Glycan and Peptide IgE Epitopes of the TNF-alpha Blockers Infliximab and Adalimumab - Precision Diagnostics by Cross-Reactivity Immune Profiling of Patient Sera. *Theranostics* 7, 4699–4709.
- Hoogenboom, H.R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 23, 1105–1116.
- Hwang, W.Y.K., and Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods San Diego Calif* 36, 3–10.

I

- 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.

J

- Jackisch, C., Kim, S.-B., Semiglazov, V., Melichar, B., Pivot, X., Hillenbach, C., Stroyakovskiy, D., Lum, B.L., Elliott, R., Weber, H.A., et al. (2015). Subcutaneous versus intravenous formulation of trastuzumab for HER2-positive early breast cancer: updated results from the phase III HannaH study. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 320–325.
- Jackisch, C., Stroyakovskiy, D., Pivot, X., Ahn, J.S., Melichar, B., Chen, S.-C., Meyenberg, C., Al-Sakaff, N., Heinzmann, D., and Hegg, R. (2019). Subcutaneous vs Intravenous Trastuzumab for Patients With ERBB2-Positive Early Breast Cancer: Final Analysis of the HannaH Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 5, e190339.
- Jaffers, G.J., Fuller, T.C., Cosimi, A.B., Russell, P.S., Winn, H.J., and Colvin, R.B. (1986). Monoclonal antibody therapy. Anti-idiotypic and non-anti-idiotypic antibodies to OKT3 arising despite intense immunosuppression. *Transplantation* 41, 572–578.
- Jahn, E.-M., and Schneider, C.K. (2009). How to systematically evaluate immunogenicity of therapeutic proteins - regulatory considerations. *New Biotechnol.* 25, 280–286.
- Jani, M., Isaacs, J.D., Morgan, A.W., Wilson, A.G., Plant, D., Hyrich, K.L., Chinoy, H., and Barton, A. (2017). High frequency of antidrug antibodies and association of random drug levels with efficacy in certolizumab pegol-treated patients with rheumatoid arthritis: results from the BRAGGSS cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 208–213.

- Jankowski, W., Park, Y., McGill, J., Maraskovsky, E., Hofmann, M., Diego, V.P., Luu, B.W., Howard, T.E., Kellerman, R., Key, N.S., et al. (2019). Peptides identified on monocyte-derived dendritic cells: a marker for clinical immunogenicity to FVIII products. *Blood Adv.* 3, 1429–1440.
- Jawa, V., Cousens, L.P., Awwad, M., Wakshull, E., Kropshofer, H., and De Groot, A.S. (2013). T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: Preclinical assessment and mitigation. *Clin. Immunol.* 149, 534–555.
- Jones, T.D., Phillips, W.J., Smith, B.J., Bamford, C.A., Nayee, P.D., Baglin, T.P., Gaston, J.S.H., and Baker, M.P. (2005). Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII. *J. Thromb. Haemost.* 3, 991–1000.
- Joubert, M.K., Luo, Q., Nashed-Samuel, Y., Wypych, J., and Narhi, L.O. (2011). Classification and Characterization of Therapeutic Antibody Aggregates. *J. Biol. Chem.* 286, 25118–25133.
- Joubert, M.K., Hokom, M., Eakin, C., Zhou, L., Deshpande, M., Baker, M.P., Goletz, T.J., Kerwin, B.A., Chirmule, N., Narhi, L.O., et al. (2012). Highly Aggregated Antibody Therapeutics Can Enhance the in Vitro Innate and Late-stage T-cell Immune Responses. *J. Biol. Chem.* 287, 25266–25279.
- Joubert, M.K., Deshpande, M., Yang, J., Reynolds, H., Bryson, C., Fogg, M., Baker, M.P., Herskovitz, J., Goletz, T.J., Zhou, L., et al. (2016). Use of In Vitro Assays to Assess Immunogenicity Risk of Antibody-Based Biotherapeutics. *PLoS ONE* 11.
- K**
- Kabashima, K., Sugita, K., Shiraishi, N., Tamamura, H., Fujii, N., and Tokura, Y. (2007). CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 1012–1016.
- Kahle, J., Orłowski, A., Stichel, D., Healey, J.F., Parker, E.T., Jacquemin, M., Krause, M., Tiede, A., Schwabe, D., Lollar, P., et al. (2017). Frequency and epitope specificity of anti-factor VIII C1 domain antibodies in acquired and congenital hemophilia A. *Blood* 130, 808–816.
- Kalluri, S.R., Grummel, V., Hracsko, Z., Pongratz, V., Pernpeintner, V., Gasperi, C., Buck, D., and Hemmer, B. (2018). Interferon-beta specific T cells are associated with the development of neutralizing antibodies in interferon-beta treated multiple sclerosis patients. *J. Autoimmun.* 88, 83–90.
- Kaplan, M.H., Hufford, M.M., and Olson, M.R. (2015). The Development and in vivo function of TH9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 295–307.
- Kaplon, H., and Reichert, J.M. (2019). Antibodies to watch in 2019. *MAbs* 11, 219–238.
- Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Forrer, K., Helk, B., and Trout, B.L. (2011). Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnol. J.* 6, 38–44.
- Kijanka, G., Bee, J.S., Bishop, S.M., Que, I., Löwik, C., and Jiskoot, W. (2016). Fate of Multimeric Oligomers, Submicron, and Micron Size Aggregates of Monoclonal Antibodies Upon Subcutaneous Injection in Mice. *J. Pharm. Sci.* 105, 1693–1704.

- Kijanka, G., Bee, J.S., Korman, S.A., Wu, Y., Roskos, L.K., Schenerman, M.A., Slütter, B., and Jiskoot, W. (2018). Submicron Size Particles of a Murine Monoclonal Antibody Are More Immunogenic Than Soluble Oligomers or Micron Size Particles Upon Subcutaneous Administration in Mice. *J. Pharm. Sci.* *107*, 2847–2859.
- Kijanka, G., Bee, J.S., Schenerman, M.A., Korman, S.A., Wu, Y., Slütter, B., and Jiskoot, W. (2019). Monoclonal Antibody Dimers Induced by Low pH, Heat, or Light Exposure Are Not Immunogenic Upon Subcutaneous Administration in a Mouse Model. *J. Pharm. Sci.*
- Kimball, J.A., Norman, D.J., Shield, C.F., Schroeder, T.J., Lisi, P., Garovoy, M., O'Connell, J.B., Stuart, F., McDiarmid, S.V., and Wall, W. (1995). The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transpl. Immunol.* *3*, 212–221.
- Klareskog, L., Gaubitz, M., Rodríguez-Valverde, V., Malaise, M., Dougados, M., Wajdula, J., and Etanercept Study 301 Investigators (2011). Assessment of long-term safety and efficacy of etanercept in a 5-year extension study in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* *29*, 238–247.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 377–391.
- Kohler, S., and Thiel, A. (2009). Life after the thymus: CD31+ and CD31– human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* *113*, 769–774.
- Kosmač, M., Avčin, T., Toplak, N., Simonini, G., Cimaz, R., and Curin Šerbec, V. (2011). Exploring the binding sites of anti-infliximab antibodies in pediatric patients with rheumatic diseases treated with infliximab. *Pediatr. Res.* *69*, 243–248.
- Kramarczyk, J.F., Kelley, B.D., and Coffman, J.L. (2008). High-throughput screening of chromatographic separations: II. Hydrophobic interaction. *Biotechnol. Bioeng.* *100*, 707–720.
- Kraus, T., Winter, G., and Engert, J. (2019). Test models for the evaluation of immunogenicity of protein aggregates. *Int. J. Pharm.* *559*, 192–200.
- Krieckaert, C.L., Nurmohamed, M.T., and Wolbink, G.J. (2012). Methotrexate reduces immunogenicity in adalimumab treated rheumatoid arthritis patients in a dose dependent manner. *Ann. Rheum. Dis.* *71*, 1914–1915.
- Krishna, M., and Nadler, S.G. (2016). Immunogenicity to Biotherapeutics – The Role of Anti-drug Immune Complexes. *Front. Immunol.* *7*.
- Kueltzo, L.A., Wang, W., Randolph, T.W., and Carpenter, J.F. (2008). Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing. *J. Pharm. Sci.* *97*, 1801–1812.
- Kumar, S., Mitchell, M.A., Rup, B., and Singh, S.K. (2012). Relationship between potential aggregation-prone regions and HLA-DR-binding T-cell immune epitopes: Implications for rational design of novel and follow-on therapeutic antibodies. *J. Pharm. Sci.* *101*, 2686–2701.

- Kuriakose, A., Chirmule, N., and Nair, P. (2016). Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications. *J. Immunol. Res.* 2016, 1298473.
- Kuus-Reichel, K., Grauer, L.S., Karavodin, L.M., Knott, C., Krusemeier, M., and Kay, N.E. (1994). Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies? *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1, 365–372.
- Kverneland, A.H., Enevold, C., Donia, M., Bastholt, L., Svane, I.M., and Nielsen, C.H. (2018). Development of anti-drug antibodies is associated with shortened survival in patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab. *Oncoimmunology* 7.

L

- van der Laken, C.J., Voskuyl, A.E., Roos, J.C., van Walsum, M.S., de Groot, E.R., Wolbink, G., Dijkmans, B.A.C., and Aarden, L.A. (2007). Imaging and serum analysis of immune complex formation of radiolabelled infliximab and anti-infliximab in responders and non-responders to therapy for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 253–256.
- Lallemand, C., Kavrochorianou, N., Steenholdt, C., Bendtzen, K., Ainsworth, M.A., Meritet, J.-F., Blanchard, B., Lebon, P., Taylor, P., Charles, P., et al. (2011). Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNF α antagonists. *J. Immunol. Methods* 373, 229–239.
- Land, W.G. (2018). Antigen in the Presence of DAMPs Induces Immunostimulatory Dendritic Cells to Promote Destructive Adaptive Immune Responses. In *Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases: Volume 1: Injury-Induced Innate Immune Responses*, W.G. Land, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 749–790.
- Lerch, T.F., Sharpe, P., Mayclin, S.J., Edwards, T.E., Lee, E., Conlon, H.D., Polleck, S., Rouse, J.C., Luo, Y., and Zou, Q. (2017). Infliximab crystal structures reveal insights into self-association. *MAbs* 9, 874–883.
- Leu, J.H., Adedokun, O.J., Gargano, C., Hsia, E.C., Xu, Z., and Shankar, G. (2019). Immunogenicity of golimumab and its clinical relevance in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and ankylosing spondylitis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 58, 441–446.
- Lichtenstein, L., Ron, Y., Kivity, S., Ben-Horin, S., Israeli, E., Fraser, G.M., Dotan, I., Chowers, Y., Confino-Cohen, R., and Weiss, B. (2015). Infliximab-Related Infusion Reactions: Systematic Review. *J. Crohns Colitis* 9, 806–815.
- Link, J., Ryner, M.L., Fink, K., Hermanrud, C., Lima, I., Brynedal, B., Kockum, I., Hillert, J., and Fogdell-Hahn, A. (2014). Human Leukocyte Antigen Genes and Interferon Beta Preparations Influence Risk of Developing Neutralizing Anti-Drug Antibodies in Multiple Sclerosis. *PLOS ONE* 9, e90479.
- Liu, Z., and Roche, P.A. (2015). Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front. Physiol.* 6, 1.
- LIU, L., BRAUN, L.J., WANG, W., RANDOLPH, T.W., and CARPENTER, J.F. (2014). Freezing-Induced Perturbation of Tertiary Structure of a Monoclonal Antibody. *J. Pharm. Sci.* 103, 1979–1986.

- Liu, M., Degner, J., Davis, J.W., Idler, K.B., Nader, A., Mostafa, N.M., and Waring, J.F. (2018). Identification of HLA-DRB1 association to adalimumab immunogenicity. *PLOS ONE* *13*, e0195325.
- Liu, Y., Reidler, H., Pan, J., Milunic, D., Qin, D., Chen, D., Vallejo, Y.R., and Yin, R. (2011). A double antigen bridging immunogenicity ELISA for the detection of antibodies to polyethylene glycol polymers. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *64*, 238–245.
- Lonberg, N. (2008). Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr. Opin. Immunol.* *20*, 450–459.

M

- Ma, C., Huang, V., Fedorak, D.K., Kroeker, K.I., Dieleman, L.A., Halloran, B.P., and Fedorak, R.N. (2014). Adalimumab dose escalation is effective for managing secondary loss of response in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *40*, 1044–1055.
- Maas, C., Hermeling, S., Bouma, B., Jiskoot, W., and Gebbink, M.F.B.G. (2007). A Role for Protein Misfolding in Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *J. Biol. Chem.* *282*, 2229–2236.
- Macdougall, I.C., Roger, S.D., de Francisco, A., Goldsmith, D.J.A., Schellekens, H., Ebbers, H., Jelkmann, W., London, G., Casadevall, N., Hörl, W.H., et al. (2012). Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis-stimulating agents: new insights. *Kidney Int.* *81*, 727–732.
- Macdougall, I.C., Casadevall, N., Locatelli, F., Combe, C., London, G.M., Di Paolo, S., Kribben, A., Fliser, D., Messner, H., McNeil, J., et al. (2015). Incidence of erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia: the Prospective Immunogenicity Surveillance Registry (PRIMS). *Nephrol. Dial. Transplant.* *30*, 451–460.
- Mahler, H.-C., Friess, W., Grauschopf, U., and Kiese, S. (2009). Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J. Pharm. Sci.* *98*, 2909–2934.
- Maillère, B., Delluc, S., and Ravot, G. (2012). La prédiction de l'immunogénicité des protéines thérapeutiques. *Médecine/Sciences* *28*, 82–88.
- Maini, R.N., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Davis, D., Macfarlane, J.D., Antoni, C., Leeb, B., Elliott, M.J., Woody, J.N., et al. (1998). Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* *41*, 1552–1563.
- Maloney, D.G., Grillo-López, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.M., Dallaire, B.K., et al. (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* *90*, 2188–2195.
- Maloney, D.G., Smith, B., and Rose, A. (2002). Rituximab: Mechanism of action and resistance. *Semin. Oncol.* *29*, 2–9.
- Matucci, A., Pratesi, S., Petroni, G., Nencini, F., Virgili, G., Milla, M., Maggi, E., and Vultaggio, A. (2013). Allergological in vitro and in vivo evaluation of patients with

- hypersensitivity reactions to infliximab. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *43*, 659–664.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 991–1045.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301–305.
- McKoy, J.M., Stonecash, R.E., Cournoyer, D., Rossert, J., Nissenson, A.R., Raisch, D.W., Casadevall, N., and Bennett, C.L. (2008). Epoetin-associated pure red cell aplasia: past, present, and future considerations. *Transfusion (Paris)* *48*, 1754–1762.
- Meric, G., Robinson, A.S., and Roberts, C.J. (2017). Driving Forces for Nonnative Protein Aggregation and Approaches to Predict Aggregation-Prone Regions. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* *8*, 139–159.
- Miheller, P., Múzes, G., Lakatos, G., Mihály, E., and Tulassay, Z. (2007). Repeated infliximab therapy after serum sickness-like reaction in Crohn's disease. *J. Emerg. Med.* *32*, 209–210.
- Miller, L., Ringler, E., Kistner, K.M., Waibler, Z., and ABIRISK Consortium (2018). Human Dendritic Cells Synergistically Activated by FVIII Plus LPS Induce Activation of Autologous CD4+ T Cells. *Thromb. Haemost.* *118*, 688–699.
- Mire-Sluis, A.R., Barrett, Y.C., Devanarayan, V., Koren, E., Liu, H., Maia, M., Parish, T., Scott, G., Shankar, G., Shores, E., et al. (2004). Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J. Immunol. Methods* *289*, 1–16.
- Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., and Ueda, N. (2018). Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents - Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. *Cytokine* *101*, 56–63.
- Moise, L., Song, C., Martin, W.D., Tassone, R., De Groot, A.S., and Scott, D.W. (2012). Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clin. Immunol.* *142*, 320–331.
- Moore, W.V., and Leppert, P. (1980). Role of aggregated human growth hormone (hGH) in development of antibodies to hGH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *51*, 691–697.
- Moots, R.J., Xavier, R.M., Mok, C.C., Rahman, M.U., Tsai, W.-C., Al-Maini, M.H., Pavelka, K., Mahgoub, E., Kotak, S., Korth-Bradley, J., et al. (2017). The impact of anti-drug antibodies on drug concentrations and clinical outcomes in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: Results from a multinational, real-world clinical practice, non-interventional study. *PLoS ONE* *12*.
- Morgan, H., Tseng, S.-Y., Gallais, Y., Leineweber, M., Buchmann, P., Riccardi, S., Nabhan, M., Lo, J., Gani, Z., Szely, N., et al. (2019). Evaluation of in vitro Assays to Assess the Modulation of Dendritic Cells Functions by Therapeutic Antibodies and Aggregates. *Front. Immunol.* *10*.
- Moussa, E.M., Panchal, J.P., Moorthy, B.S., Blum, J.S., Joubert, M.K., Narhi, L.O., and Topp, E.M. (2016a). Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates. *J. Pharm. Sci.* *105*, 417–430.

Moussa, E.M., Kotarek, J., Blum, J.S., Marszal, E., and Topp, E.M. (2016b). Physical Characterization and Innate Immunogenicity of Aggregated Intravenous Immunoglobulin (IGIV) in an In Vitro Cell-Based Model. *Pharm. Res.* *33*, 1736–1751.

Mulleman, D., Méric, J.-C., Paintaud, G., Ducourau, E., Magdelaine-Beuzelin, C., Valat, J.-P., and Goupille, P. (2009). Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* *11*, R178.

N

Nabhan, M., Gallais, Y., Pallardy, M., and Turbica, I. (2019). Growth hormone aggregates activation of human dendritic cells is controlled by Rac1 and PI3 kinase signaling pathways. *J. Pharm. Sci.*

Nagorsen, D., Marincola, F.M., and Panelli, M.C. (2004). Cytokine and chemokine expression profiles of maturing dendritic cells using multiprotein platform arrays. *Cytokine* *25*, 31–35.

Narhi, L.O., Schmit, J., Bechtold-Peters, K., and Sharma, D. (2012). Classification of protein aggregates. *J. Pharm. Sci.* *101*, 493–498.

Nasser, Y., Labetoulle, R., Harzallah, I., Berger, A.-E., Roblin, X., and Paul, S. (2018). Comparison of Point-of-Care and Classical Immunoassays for the Monitoring Infliximab and Antibodies Against Infliximab in IBD. *Dig. Dis. Sci.* *63*, 2714–2721.

Nejadnik, M.R., Randolph, T.W., Volkin, D.B., Schöneich, C., Carpenter, J.F., Crommelin, D.J.A., and Jiskoot, W. (2018). Postproduction Handling and Administration of Protein Pharmaceuticals and Potential Instability Issues. *J. Pharm. Sci.* *107*, 2013–2019.

Nencini, F., Vultaggio, A., Pratesi, S., Cammelli, D., Milla, M., Fiori, G., Bagnoli, S., Prignano, F., Romagnani, S., Maggi, E., et al. (2018). The Kinetics of Antidrug Antibodies, Drug Levels, and Clinical Outcomes in Infliximab-Exposed Patients with Immune-Mediated Disorders. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* *6*, 2065-2072.e2.

Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 34–47.

O

O’Neil, B.H., Allen, R., Spigel, D.R., Stinchcombe, T.E., Moore, D.T., Berlin, J.D., and Goldberg, R.M. (2007). High incidence of cetuximab-related infusion reactions in Tennessee and North Carolina and the association with atopic history. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 3644–3648.

Ortho Multicenter Transplant Study Group (1985). A randomized clinical trial of OKT3 monoclonal antibody for acute rejection of cadaveric renal transplants. *N. Engl. J. Med.* *313*, 337–342.

P

Papamichael, K., Vajravelu, R.K., Osterman, M.T., and Cheifetz, A.S. (2018). Long-Term Outcome of Infliximab Optimization for Overcoming Immunogenicity in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Dig. Dis. Sci.* *63*, 761–767.

- Papamichael, K., Vogelzang, E.H., Lambert, J., Wolbink, G., and Cheifetz, A.S. (2019). Therapeutic drug monitoring with biologic agents in immune mediated inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* *15*, 837–848.
- Pardeshi, N.N., Qi, W., Dahl, K., Caplan, L., and Carpenter, J.F. (2017). Micro- And Nanoparticles Delivered in Intravenous Saline and in an Intravenous Solution of a Therapeutic Antibody Product. *J. Pharm. Sci.* *106*, 511–520.
- Paul, S., Moreau, A.C., Del Tedesco, E., Rinaudo, M., Phelip, J.-M., Genin, C., Peyrin-Biroulet, L., and Roblin, X. (2014). Pharmacokinetics of adalimumab in inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* *20*, 1288–1295.
- Peng, A., Gaitonde, P., Kosloski, M.P., Miclea, R.D., Varma, P., and Balu-Iyer, S.V. (2009). Effect of route of administration of human recombinant factor VIII on its immunogenicity in Hemophilia A mice. *J. Pharm. Sci.* *98*, 4480–4484.
- Perchiacca, J.M., Bhattacharya, M., and Tessier, P.M. (2011). Mutational analysis of domain antibodies reveals aggregation hotspots within and near the complementarity determining regions. *Proteins* *79*, 2637–2647.
- Picard, M., and Galvão, V.R. (2017). Current Knowledge and Management of Hypersensitivity Reactions to Monoclonal Antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* *5*, 600–609.
- Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B.E., Dal Cin, E., Allavena, P., and Di Carlo, V. (2000). Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 4443–4451.
- Pineda, C., Castañeda Hernández, G., Jacobs, I.A., Alvarez, D.F., and Carini, C. (2016). Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *Biodrugs* *30*, 195–206.
- Pisupati, K., Benet, A., Tian, Y., Okbazghi, S., Kang, J., Ford, M., Saveliev, S., Sen, K.I., Carlson, E., Tolbert, T.J., et al. (2017). Biosimilarity under stress: A forced degradation study of Remicade® and Remsima™. *MAbs* *9*, 1197–1209.
- Plank, M.W., Kaiko, G.E., Maltby, S., Weaver, J., Tay, H.L., Shen, W., Wilson, M.S., Durum, S.K., and Foster, P.S. (2017). Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *198*, 2182–2190.
- Polák, P., Peric, P., Louw, I., Gaylord, S.M., Williams, T., Becker, J.-C., Pedersen, R., Korth-Bradley, J., and Vlahos, B. (2019). A single-arm, open-label study to assess the immunogenicity, safety, and efficacy of etanercept manufactured using the serum-free, high-capacity manufacturing process administered to patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Rheumatol.* *6*, 23–28.
- Polumuri, S.K., Haile, L.A., Ireland, D.D.C., and Verthelyi, D. (2018). Aggregates of IVIG or Avastin, but not HSA, modify the response to model innate immune response modulating impurities. *Sci. Rep.* *8*, 11477.
- Pouw, M.F., Krieckaert, C.L., Nurmohamed, M.T., van der Kleij, D., Aarden, L., Rispen, T., and Wolbink, G. (2015). Key findings towards optimising adalimumab treatment: the concentration-effect curve. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 513–518.

Praditpornsilpa, K., Kupatawintu, P., Mongkonsritagoon, W., Supasyndh, O., Jootar, S., Intarakumthornchai, T., Pongskul, C., Prasithsirikul, W., Achavanuntakul, B., Ruangrarnchanasetr, P., et al. (2009). The association of anti-r-HuEpo-associated pure red cell aplasia with HLA-DRB1*09-DQB1*0309. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *24*, 1545–1549.

Pratesi, S., Nencini, F., Grosso, F., Dies, L., Bormioli, S., Cammelli, D., Maggi, E., Matucci, A., Vultaggio, A., and Consortium, A. (2019). T Cell Response to Infliximab in Exposed Patients: A Longitudinal Analysis. *Front. Immunol.* *9*.

Pratt, K.P. (2018). Anti-Drug Antibodies: Emerging Approaches to Predict, Reduce or Reverse Biotherapeutic Immunogenicity. *Antibodies* *7*.

Q

Quianzon, C.C., and Cheikh, I. (2012). History of insulin. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* *2*.

Quistrebert, J., Hässler, S., Bachelet, D., Mbogning, C., Musters, A., Tak, P.P., Wijbrandts, C.A., Herenius, M., Bergstra, S.A., Akdemir, G., et al. (2018). Incidence and risk factors for adalimumab and infliximab anti-drug antibodies in rheumatoid arthritis: A European retrospective multicohort analysis. *Semin. Arthritis Rheum.*

R

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.

Roberts, C.J. (2014). Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol.* *32*, 372–380.

Roche, P.A., and Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 203–216.

Romagnani, P., Maggi, L., Mazzinghi, B., Cosmi, L., Lasagni, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Angeli, R., Rotondi, M., Fili, L., et al. (2005). CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 1372–1379.

Rombach-Riegraf, V., Karle, A.C., Wolf, B., Sordé, L., Koepke, S., Gottlieb, S., Krieg, J., Djidja, M.-C., Baban, A., Spindeldreher, S., et al. (2014). Aggregation of Human Recombinant Monoclonal Antibodies Influences the Capacity of Dendritic Cells to Stimulate Adaptive T-Cell Responses In Vitro. *PLoS ONE* *9*, e86322.

Rosa, M., Roberts, C.J., and Rodrigues, M.A. (2017). Connecting high-temperature and low-temperature protein stability and aggregation. *PLoS ONE* *12*.

Rosales, C., and Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity.

Rosenberg, A.S. (2006). Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. *AAPS J.* *8*, E501–E507.

- Ross, C., Clemmesen, K.M., Svenson, M., Sørensen, P.S., Koch-Henriksen, N., Skovgaard, G.L., and Bendtzen, K. (2000). Immunogenicity of interferon-beta in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. Danish Multiple Sclerosis Study Group. *Ann. Neurol.* *48*, 706–712.
- Rougeot, C., Marchand, P., Dray, F., Girard, F., Job, J.C., Pierson, M., Ponte, C., Rochiccioli, P., and Rappaport, R. (1991). Comparative study of biosynthetic human growth hormone immunogenicity in growth hormone deficient children. *Horm. Res.* *35*, 76–81.
- Roughton, B.C., Iyer, L.K., Bertelsen, E., Topp, E.M., and Camarda, K.V. (2013). Protein aggregation and lyophilization: Protein structural descriptors as predictors of aggregation propensity. *Comput. Chem. Eng.* *58*, 369–377.
- Rubic-Schneider, T., Kuwana, M., Christen, B., Aßenmacher, M., Hainzl, O., Zimmermann, F., Fischer, R., Koppenburg, V., Chibout, S.-D., Wright, T.M., et al. (2017). T-cell assays confirm immunogenicity of tungsten-induced erythropoietin aggregates associated with pure red cell aplasia. *Blood Adv.* *1*, 367–379.

S

- Safdari, Y., Farajnia, S., Asgharzadeh, M., and Khalili, M. (2013). Antibody humanization methods – a review and update. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* *29*, 175–186.
- Sanchez-Trincado, J.L., Gomez-Perosanz, M., and Reche, P.A. (2017). Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction.
- Sato, K., and Fujita, S. (2007). Dendritic Cells-Nature and Classification. *Allergol. Int.* *56*, 183–191.
- Sauna, Z.E., Lagassé, D., Pedras-Vasconcelos, J., Golding, B., and Rosenberg, A.S. (2018). Evaluating and Mitigating the Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *Trends Biotechnol.* *36*, 1068–1084.
- Sazonovs, A., Kennedy, N.A., Moutsianas, L., Heap, G.A., Rice, D.L., Reppell, M., Bewshea, C.M., Chanchlani, N., Walker, G.J., Perry, M.H., et al. (2019). HLA-DQA1*05 Carriage Associated With Development of Anti-Drug Antibodies to Infliximab and Adalimumab in Patients With Crohn’s Disease. *Gastroenterology* *0*.
- Scheen, A.J. (2009). [International classification of various types of monoclonal antibodies]. *Rev. Med. Liege* *64*, 244–247.
- Schellekens, H. (2002). Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin. Ther.* *24*, 1720–1740; discussion 1719.
- Schellekens, H. (2005). Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *20 Suppl* *6*, vi3-9.
- Scheu, S., Ali, S., Ruland, C., Arolt, V., and Alferink, J. (2017). The C-C Chemokines CCL17 and CCL22 and Their Receptor CCR4 in CNS Autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- van Schie, K.A., Hart, M.H., de Groot, E.R., Kruithof, S., Aarden, L.A., Wolbink, G.J., and Rispen, T. (2015). The antibody response against human and chimeric anti-TNF

- therapeutic antibodies primarily targets the TNF binding region. *Ann. Rheum. Dis.* *74*, 311–314.
- Schlapschy, M., Gruber, H., Gresch, O., Schäfer, C., Renner, C., Pfreundschuh, M., and Skerra, A. (2004). Functional humanization of an anti-CD30 Fab fragment for the immunotherapy of Hodgkin's lymphoma using an in vitro evolution approach. *Protein Eng. Des. Sel.* *17*, 847–860.
- van Schouwenburg, P.A., Rispens, T., and Wolbink, G.J. (2013). Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* *9*, 164–172.
- Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S41–S52.
- Schultz, H.S., Reedtz-Runge, S.L., Bäckström, B.T., Lamberth, K., Pedersen, C.R., Kvarnhammar, A.M., and Consortium, on behalf of the A. (2017). Quantitative analysis of the CD4+ T cell response to therapeutic antibodies in healthy donors using a novel T cell:PBMC assay. *PLOS ONE* *12*, e0178544.
- Sedq, A.S., van Duijvenvoorde, R.B., Jiskoot, W., and Nejadnik, M.R. (2016). No Touching! Abrasion of Adsorbed Protein Is the Root Cause of Subvisible Particle Formation During Stirring. *J. Pharm. Sci.* *105*, 519–529.
- Seidl, A., Hainzl, O., Richter, M., Fischer, R., Böhm, S., Deutel, B., Hartinger, M., Windisch, J., Casadevall, N., London, G.M., et al. (2011). Tungsten-Induced Denaturation and Aggregation of Epoetin Alfa During Primary Packaging as a Cause of Immunogenicity. *Pharm. Res.* *29*, 1454–1467.
- Seong, S.-Y., and Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 469–478.
- Shankar, G., Devanarayan, V., Amaravadi, L., Barrett, Y.C., Bowsher, R., Finco-Kent, D., Fiscella, M., Gorovits, B., Kirschner, S., Moxness, M., et al. (2008). Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *48*, 1267–1281.
- Shomali, M., Tanriverdi, S., Freitag, A.J., Engert, J., Winter, G., Siedler, M., Kaymakcalan, Z., Carpenter, J.F., and Randolph, T.W. (2015). Dose levels in particulate-containing formulations impact anti-drug antibody responses to murine monoclonal antibody in mice. *J. Pharm. Sci.* *104*, 1610–1621.
- Siljehult, F., Ärlestig, L., Eriksson, C., and Rantapää-Dahlqvist, S. (2018). Concentrations of infliximab and anti-drug antibodies in relation to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* *47*, 345–350.
- Silverstein, A.M. (2000). Clemens Freiherr von Pirquet: explaining immune complex disease in 1906. *Nat. Immunol.* *1*, 453–455.
- Singh, S.K. (2011). Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J. Pharm. Sci.* *100*, 354–387.
- Smolen, J., Landewé, R.B., Mease, P., Brzezicki, J., Mason, D., Luijstens, K., van Vollenhoven, R.F., Kavanaugh, A., Schiff, M., Burmester, G.R., et al. (2009). Efficacy and safety of

certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* *68*, 797–804.

Stas, P., Lasters, I., and française de Laure Coulombel, T. (2009). Immunogénicité de protéines d'intérêt thérapeutique: Les anticorps monoclonaux thérapeutiques. *Médecine/Sciences* *25*, 1070–1077.

Steenholdt, C., Svenson, M., Bendtzen, K., Thomsen, O.Ø., Brynskov, J., and Ainsworth, M.A. (2011). Severe infusion reactions to infliximab: aetiology, immunogenicity and risk factors in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *34*, 51–58.

Suan, D., Sundling, C., and Brink, R. (2017). Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Curr. Opin. Immunol.* *45*, 97–102.

Swanson, S.J., Ferbas, J., Mayeux, P., and Casadevall, N. (2004). Evaluation of methods to detect and characterize antibodies against recombinant human erythropoietin. *Nephron Clin. Pract.* *96*, c88-95.

T

Takaba, H., and Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* *38*, 805–816.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* *140*, 805–820.

Telikepalli, S., Shinogle, H.E., Thapa, P.S., Kim, J.H., Deshpande, M., Jawa, V., Middaugh, C.R., Narhi, L.O., Joubert, M.K., and Volkin, D.B. (2015). Physical Characterization and In Vitro Biological Impact of Highly Aggregated Antibodies Separated into Size-Enriched Populations by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *J. Pharm. Sci.* *104*, 1575–1591.

Telikepalli, S.N., Kumru, O.S., Kalonia, C., Esfandiary, R., Joshi, S.B., Middaugh, C.R., and Volkin, D.B. (2014). Structural Characterization of IgG1 mAb Aggregates and Particles Generated under Various Stress Conditions. *J. Pharm. Sci.* *103*, 796–809.

Thistlethwaite, J.R., Stuart, J.K., Mayes, J.T., Gaber, A.O., Woodle, S., Buckingham, M.R., and Stuart, F.P. (1988). Complications and monitoring of OKT3 therapy. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* *11*, 112–119.

Tourdot, S., and Hickling, T.P. (2019). Nonclinical immunogenicity risk assessment of therapeutic proteins. *Bioanalysis*.

Tovey, M.G., and Lallemand, C. (2010). Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Interferons. *Pharmaceuticals* *3*, 1162–1186.

U

Uchino, T., Miyazaki, Y., Yamazaki, T., and Kagawa, Y. (2017). Immunogenicity of protein aggregates of a monoclonal antibody generated by forced shaking stress with siliconized and nonsiliconized syringes in BALB/c mice. *J. Pharm. Pharmacol.* *69*, 1341–1351.

Ungar, B., Chowers, Y., Yavzori, M., Picard, O., Fudim, E., Har-Noy, O., Kopylov, U., Eliakim, R., Ben-Horin, S., and ABIRISK consortium (2014). The temporal evolution of

antidrug antibodies in patients with inflammatory bowel disease treated with infliximab. *Gut* 63, 1258–1264.

Ungar, B., Engel, T., Yablecovitch, D., Lahat, A., Lang, A., Avidan, B., Har-Noy, O., Carter, D., Levhar, N., Selinger, L., et al. (2018). Prospective Observational Evaluation of Time-Dependency of Adalimumab Immunogenicity and Drug Concentrations: The POETIC Study. *Am. J. Gastroenterol.* 113, 890–898.

U.S. Food and Drug Administration (2019). Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products - Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection Guidance for Industry (U.S. Food and Drug Administration).

V

Van Stappen, T., Vande Castele, N., Van Assche, G., Ferrante, M., Vermeire, S., and Gils, A. (2018). Clinical relevance of detecting anti-infliximab antibodies with a drug-tolerant assay: post hoc analysis of the TAXIT trial. *Gut* 67, 818–826.

Vande Castele, N., Ferrante, M., Van Assche, G., Ballet, V., Compennolle, G., Van Steen, K., Simoens, S., Rutgeerts, P., Gils, A., and Vermeire, S. (2015). Trough concentrations of infliximab guide dosing for patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 148, 1320-1329.e3.

Vazquez, M.I., Catalan-Dibene, J., and Zlotnik, A. (2015). B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine* 74, 318–326.

Vázquez-Rey, M., and Lang, D.A. (2011). Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 1494–1508.

Verdijk, P., van Veelen, P.A., de Ru, A.H., Hensbergen, P.J., Mizuno, K., Koerten, H.K., Koning, F., Tensen, C.P., and Mommaas, A.M. (2004). Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane. *Eur. J. Immunol.* 34, 156–164.

Vermeire, S., Noman, M., Van Assche, G., Baert, F., D’Haens, G., and Rutgeerts, P. (2007). Effectiveness of concomitant immunosuppressive therapy in suppressing the formation of antibodies to infliximab in Crohn’s disease. *Gut* 56, 1226–1231.

Veronese, F.M., and Mero, A. (2008). The impact of PEGylation on biological therapies. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 22, 315–329.

Verstockt, B., Moors, G., Bian, S., Van Stappen, T., Van Assche, G., Vermeire, S., Gils, A., and Ferrante, M. (2018). Influence of early adalimumab serum levels on immunogenicity and long-term outcome of anti-TNF naive Crohn’s disease patients: the usefulness of rapid testing. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 48, 731–739.

Vessely, C., Fradkin, A.H., and Carpenter, J.F. (2015). Meeting biopharmaceutical analytical requirements for subvisible particle sizing and counting. *Eur. Pharm. Rev.* 20, 71–75.

Vultaggio, A., Matucci, A., Nencini, F., Pratesi, S., Parronchi, P., Rossi, O., Romagnani, S., and Maggi, E. (2010). Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions. *Allergy* 65, 657–661.

- Vultaggio, A., Matucci, A., Nencini, F., Pratesi, S., Petroni, G., Cammelli, D., Alterini, R., Rigacci, L., Romagnani, S., and Maggi, E. (2012). Drug-specific Th2 cells and IgE antibodies in a patient with anaphylaxis to rituximab. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *159*, 321–326.
- Vultaggio, A., Petroni, G., Pratesi, S., Nencini, F., Cammelli, D., Milla, M., Prignano, F., Annese, V., Romagnani, S., Maggi, E., et al. (2016). Circulating T cells to infliximab are detectable mainly in treated patients developing anti-drug antibodies and hypersensitivity reactions. *Clin. Exp. Immunol.* *186*, 364–372.
- Vultaggio, A., Nencini, F., Pratesi, S., Cammelli, D., Totaro, M., Romagnani, S., Maggi, E., and Matucci, A. (2017). IL-10–Producing Infliximab-Specific T Cells Regulate the Antidrug T Cell Response in Exposed Patients. *J. Immunol.* *199*, 1283–1289.
- Vultaggio, A., Nencini, F., Carraresi, A., Pratesi, S., Movérare, R., Eriksson, C., Venemalm, L., Maggi, E., and Matucci, A. (2018). IgG4 anti-infliximab in treated patients: Clinical impact and temporal evolution. *Allergy* *73*, 2172–2181.

W

- Wadhwa, M., Knezevic, I., Kang, H.-N., and Thorpe, R. (2015). Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: An overview of assays and their utility. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* *43*, 298–306.
- Walsh, K.P., and Mills, K.H.G. (2013). Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol.* *34*, 521–530.
- Wang, W., and Roberts, C.J. (2018). Protein aggregation - Mechanisms, detection, and control. *Int. J. Pharm.* *550*, 251–268.
- Wang, S.-L., Ohrmund, L., Hauenstein, S., Salbato, J., Reddy, R., Monk, P., Lockton, S., Ling, N., and Singh, S. (2012). Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum. *J. Immunol. Methods* *382*, 177–188.
- Wang, W., Leu, J., Watson, R., Xu, Z., and Zhou, H. (2018). Investigation of the Mechanism of Therapeutic Protein-Drug Interaction Between Methotrexate and Golimumab, an Anti-TNF α Monoclonal Antibody. *AAPS J.* *20*, 63.
- Wang, X., Singh, S.K., and Kumar, S. (2010). Potential aggregation-prone regions in complementarity-determining regions of antibodies and their contribution towards antigen recognition: a computational analysis. *Pharm. Res.* *27*, 1512–1529.
- Werner, B.P., and Winter, G. (2018). Expanding Bedside Filtration—A Powerful Tool to Protect Patients From Protein Aggregates. *J. Pharm. Sci.* *107*, 2775–2788.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* *322*, 271–275.
- Wu, H., Kroe-Barrett, R., Singh, S., Robinson, A.S., and Roberts, C.J. (2014). Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies. *FEBS Lett.* *588*, 936–941.

X

Xing, Y., and Hogquist, K.A. (2012). T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.

Y

Yin, L., Chen, X., Tiwari, A., Vicini, P., and Hickling, T.P. (2015). The Role of Aggregates of Therapeutic Protein Products in Immunogenicity: An Evaluation by Mathematical Modeling. *J. Immunol. Res.* 2015, 401956.

Yuan, X., and Malek, T.R. (2012). Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells. *Hum. Immunol.* 73, 773–782.

Z

Zarnitsyna, V.I., Evavold, B.D., Schoettle, L.N., Blattman, J.N., and Antia, R. (2013). Estimating the Diversity, Completeness, and Cross-Reactivity of the T Cell Repertoire. *Front. Immunol.* 4.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–1569.

ANNEXES

Annexe I

Growth Hormone Aggregates Activation of Human Dendritic Cells Is Controlled by Rac1 and PI3 Kinase Signaling Pathways.

Myriam Nabhan, Yann Gallais, Marc Pallardy, Isabelle Turbica

Journal of Pharmaceutical Sciences. 2019 ; doi.org/10.1016/j.xphs.2019.09.007.

Annexe II

Evaluation of in vitro Assays to Assess the Modulation of Dendritic Cells Functions by Therapeutic Antibodies and Aggregates.

Hannah Morgan, Su-Yi Tseng, Yann Gallais, Margret Leineweber, Pascale Buchmann, Sabrina Riccardi, Myriam Nabhan, Jeannette Lo, Zaahira Gani, Natacha Szely, Cornelia S. Zhu, Ming Yang, Andrea Kiessling, Hans-Werner Vohr, Marc Pallardy, Fred Aswad and Isabelle Turbica, on behalf of the ABIRISK Consortium

Frontiers in Immunology. 2019;10:601. doi: 10.3389/fimmu.2019.00601.



OPEN ACCESS

Edited by:

Florent Ginhoux,
Singapore Immunology Network
(A*STAR), Singapore

Reviewed by:

Nuala Mooney,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France
Willem Van Eden,
Utrecht University, Netherlands

***Correspondence:**

Isabelle Turbica
isabelle.turbica@u-psud.fr

†Present Address:

Zaahira Gani,
The Novartis Foundation, Basel,
Switzerland
Ming Yang,
Henlix, Inc. Fremont, CA,
United States
Andrea Kiessling,
UCB Pharma, Slough,
United Kingdom
Hans-Werner Vohr,
HSE Dr. Hofmann GmbH, Wuppertal,
Germany

Specialty section:

This article was submitted to
Antigen Presenting Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 11 May 2018

Accepted: 06 March 2019

Published: 28 March 2019

Citation:

Morgan H, Tseng S-Y, Gallais Y,
Leineweber M, Buchmann P, Riccardi
S, Nabhan M, Lo J, Gani Z, Szely N,
Zhu CS, Yang M, Kiessling A, Vohr
H-W, Pallardy M, Aswad F and
Turbica I (2019) Evaluation of *in vitro*
Assays to Assess the Modulation of
Dendritic Cells Functions by
Therapeutic Antibodies and
Aggregates. *Front. Immunol.* 10:601.
doi: 10.3389/fimmu.2019.00601

Evaluation of *in vitro* Assays to Assess the Modulation of Dendritic Cells Functions by Therapeutic Antibodies and Aggregates

Hannah Morgan¹, Su-Yi Tseng², Yann Gallais³, Margret Leineweber⁴,
Pascale Buchmann⁴, Sabrina Riccardi¹, Myriam Nabhan³, Jeannette Lo², Zaahira Gani^{††},
Natacha Szely³, Cornelia S. Zhu⁴, Ming Yang^{2†}, Andrea Kiessling^{1†}, Hans-Werner Vohr^{4†},
Marc Pallardy³, Fred Aswad² and Isabelle Turbica^{3*} on behalf of the ABIRISK Consortium

¹ Translational Immunology, Discovery & Investigative Safety, Preclinical Safety, Novartis Institute for Biomedical Research, Basel, Switzerland, ² Biologics Research, Lead Discovery, Immunoprofiling, Bayer US LLC, San Francisco, CA, United States, ³ Inflammation, Chimiokines et Immunopathologie, INSERM, Fac. de pharmacie - Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France, ⁴ Immunotoxicology, Pharmaceuticals, Research and Development, Bayer AG, Wuppertal, Germany

Therapeutic antibodies have the potential to induce immunogenicity leading to the development of anti-drug antibodies (ADA) that consequently may result in reduced serum drug concentrations, a loss of efficacy or potential hypersensitivity reactions. Among other factors, aggregated antibodies have been suggested to promote immunogenicity, thus enhancing ADA production. Dendritic cells (DC) are the most efficient antigen-presenting cell population and are crucial for the initiation of T cell responses and the subsequent generation of an adaptive immune response. This work focuses on the development of predictive *in vitro* assays that can monitor DC maturation, in order to determine whether drug products have direct DC stimulatory capabilities. To this end, four independent laboratories aligned a common protocol to differentiate human monocyte-derived DC (moDC) that were treated with either native or aggregated preparations of infliximab, natalizumab, adalimumab, or rituximab. These drug products were subjected to different forms of physical stress, heat and shear, resulting in aggregation and the formation of subvisible particles. Each partner developed and optimized assays to monitor diverse end-points of moDC maturation: measuring the upregulation of DC activation markers via flow cytometry, analyzing cytokine, and chemokine production via mRNA and protein quantification and identifying cell signaling pathways via quantification of protein phosphorylation. These study results indicated that infliximab, with the highest propensity to form aggregates when heat-stressed, induced a marked activation of moDC as measured by an increase in CD83 and CD86 surface expression, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF α , CCL3, and CCL4 transcript upregulation and release of respective proteins, and phosphorylation of the intracellular signaling proteins Syk, ERK1/2, and Akt. In contrast, natalizumab, which does not aggregate under these stress conditions, induced no DC activation in any assay system, whereas adalimumab

or rituximab aggregates induced only slight parameter variation. Importantly, the data generated in the different assay systems by each partner site correlated and supported the use of these assays to monitor drug-intrinsic propensities to drive maturation of DC. This moDC assay is also a valuable tool as an *in vitro* model to assess the intracellular mechanisms that drive DC activation by aggregated therapeutic proteins.

Keywords: anti-drug antibodies, immunogenicity, dendritic cells, *in vitro* assays, aggregates, intracellular signaling

INTRODUCTION

The clinical use of therapeutic antibodies has enabled significant improvements in the treatment of an increasing number of severe diseases. However, all biopharmaceuticals have immunogenic potential in patients, leading to the development of anti-drug antibodies (ADA) that may have neutralizing effects on the drug, resulting in reduced effective concentrations of the therapeutic biopharmaceutical in serum, and a potentially reduced clinical response (1, 2). ADA may also induce potential hypersensitivity reactions and adverse effects such as infusion reactions (3–5). Immunogenicity of therapeutic antibodies has been particularly studied in the context of inflammatory diseases. Indeed, ADA development in patients has been reported with variable frequencies, depending on clinical studies that include different patient populations, as well as on the employed detection method. Although the humanization status of the administered antibody allows for a potential reduction in immunogenicity, it is rarely abolished. Thus, ADA frequencies against chimeric antibodies such as infliximab or rituximab may vary from 10 to 50% (6–8), whereas ADA frequencies in patients treated with the fully human antibody adalimumab may range from 20 to 25% (6, 9, 10) and patients treated with the humanized antibody natalizumab may develop ADA with a frequency of ~6–10% (11, 12).

A variety of patient-specific and bioproduct-specific factors are involved in the onset and progression of immunogenicity (13–15). Among factors related to the drug product itself, it is now well-accepted that protein aggregation is associated with an increased potential for immunogenicity (16, 17). The aggregation process of therapeutic proteins may occur at any stage of the manufacturing process, storage, transport, or delivery to the patient. It is governed by a variety of critical environmental conditions (e.g., temperature, pH, ionic strength, shear forces) that can alter the protein either by physical or chemical damage (18, 19) and trigger the protein aggregation through different pathways. Thus, aggregation can occur either between unfolded antibody monomers or between folded molecules (20). In clinical practice, the use of concentrated antibody preparations that are administered subcutaneously may favor the aggregation process because of the forced interaction of monomers in a confined space (21). Also, micro- and nanoparticles have been detected in the solutions prepared for intravenous administration (22).

Interactions of protein aggregates with the immune system have been studied through *in vivo* models that in particular highlighted a correlation between antibody aggregates and ADA

development (23–26). Furthermore, *in vitro* studies focused on aggregate interactions with immune cells, in order to address the mechanisms leading to ADA production. Two hypotheses are currently explored, well-described by Moussa et al. (27). One suggests that aggregates can bind to B-cell receptors through repetitive conformational epitopes and elicit T-cell independent polyclonal B-cell activation with low affinity ADA production. The second hypothesis is that aggregates are recognized and captured more efficiently by antigen presenting cells (APC) and elicit a T-cell dependent activation of B-cells that undergo isotype switch to produce high affinity ADA. In this latter context, dendritic cells (DC) are the most efficient APC population that are crucial for the initiation of T cell responses and the subsequent generation of immunogenicity. Thus, DC can potentially interact with therapeutic antibodies and aggregates through innate receptors such as immunoglobulin receptors (FcγRs), danger signal receptors (e.g., TLRs), lectin receptors, or complement receptors as these molecules are broadly expressed on DC surface (28–30). Indeed it was shown that IgG1 aggregates have a high affinity for purified FcγR (31). Another study highlighted that TLR2 and TLR4, as well as FcγRI and FcγRIII, and the C3b protein were involved in the secretion of inflammatory cytokines by PBMC stimulated by stir-stressed monoclonal antibodies (32).

Recent work has provided some evidence that DC could be a valuable model to assess the potential immunogenicity of therapeutic antibodies and their aggregates. Indeed it was demonstrated that IgG aggregates induced monocyte-derived dendritic cell (moDC) maturation with the upregulation of phenotypic maturation markers and production of inflammatory cytokines (33–35). Moreover, peptides presented by HLA-DR molecules were identified and it was shown that highly aggregated antibodies increased the quantity of antigen-derived HLA-DR associated peptides (33). Also, uptake of IgG aggregates and localization in moDC endosomal compartment was increased, compared to monomeric counterparts (34). Finally the activation level of moDC stimulated with aggregated rituximab or aggregated polyclonal IgG were sufficient to promote CD4+ T-cell proliferation and cytokine secretion (35).

This study focuses on optimizing methods to monitor diverse end-points of DC activation by therapeutic antibodies and aggregates. Our goal is to define the appropriate read outs and settings to evaluate moDC maturation, by developing predictive *in vitro* assays that determine whether antibody preparations have intrinsic DC stimulatory capabilities that are independent of the antigen recognition (Fab) part of the

molecule. For this purpose, four assays were designed to test the effect of four therapeutic monoclonal antibodies (infliximab, rituximab, adalimumab and natalizumab) currently used for treating inflammatory diseases, and to test the related aggregated preparations, on moDC cultures. Each assay was independently evaluated by four different laboratories for at least 12 donors.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Antibody Aggregates

Antibodies used for this study were commercially available infliximab (Remicade[®], 10 mg/mL), a chimeric anti-TNF- α antibody, rituximab (Mabthera[®], 10 mg/mL), a chimeric anti-CD20 antibody, natalizumab (Tysabri[®], 20 mg/mL), a humanized antibody which binds to $\alpha 4\beta 1$ -integrin and adalimumab (Humira[®], 50 mg/mL), which is a fully human anti-TNF- α antibody. Antibodies preparations were subjected to either shear or heat stress, with two different intensities. Shear stresses was induced by filling and emptying a syringe through a 19 G needle for three (shear stress level 1, SSL1) or 10 (shear stress level 2, SSL2) cycles. Heat stress consisted of heating the samples at 55°C for 6 h (heat stress level 1, HSL1) or 24 h (heat stress level 2, HSL2). Aggregates were characterized by measuring particle numbers by microflow imaging, dynamic light scattering, size exclusion chromatography, and turbidity analysis. Detailed description of aggregates preparation and characterization is described elsewhere (manuscript in preparation). Native or aggregated antibodies were prepared and aliquoted by a single laboratory partner and conserved at -80°C. Aliquots were distributed among the other partners and kept at -80°C until use.

Generation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells (moDC)

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from buffy coats or whole blood directly obtained from Blood donation centers: Etablissement Français du Sang (France), Interregionale Blutspende Schweizerisches Rotes Kreuz (Switzerland) and CRS Clinical Research Services, Wuppertal (Germany). For each site, healthy donors gave their written consent for the use of blood donation for research purposes. Also, PBMC directly isolated and frozen were purchased from vendor (AllCells, CA, USA).

In each partner lab's, PBMC isolation was achieved by density gradient centrifugation. Monocytes were isolated from the mononuclear fraction either by magnetic positive selection with MiniMacs or MidiMacs separation columns and anti-CD14 antibodies coated on magnetic beads (Miltenyi Biotech). Purified monocytes were cultured in the presence of GM-CSF (50 ng/ml) and IL-4 (50 ng/ml) (R&D Systems) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Pyruvate, 1% L-glutamine, 1% HEPES, and 1% non-essential amino acids, at 37°C in humidified air containing 5% CO₂. Cytokines were replenished in the cell culture on day 3 and within 6 days monocytes had differentiated into moDCs with an immature phenotype (CD11c+/CD14-).

On Day 6, a quality control of the immature DC population was performed by flow cytometry.

moDC Treatment With Aggregated or Native Antibodies

On Day 6, immature moDC were harvested and washed in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin and 1% Pyruvate. Cells were counted in the presence of trypan blue to confirm viability. Following centrifugation (5 min, 360 g, 4°C) supernatants were discarded and cells were resuspended in warm medium and then seeded in the appropriate plates, depending on the experiment. Aggregates or native antibodies were then added at concentrations of 10, or 100 μ g/mL. Maturation cocktail (IL-6, IL-1 β , TNF- α , at 10 ng/mL, and PGE-2 at 1 μ g/mL, all from R&D Systems or Sigma-Aldrich) or Lipopolysaccharide (LPS, from *Escherichia coli* 055:B5 strain 25 ng/ml, Sigma-Aldrich) were used as positive maturation controls. The stimulation time at 37°C ranged from 15 min to 48 h depending on the experiment.

Flow Cytometric Analysis

Immature moDC were seeded into 24-well cell culture plates (Nunc, Langensfeld, Germany) at 1 mL per well (1×10^6 /well). 50 μ L of test items were added to each well to reach final concentrations of test items 10 or 100 μ g/mL. Cells were incubated with test items at 37°C and 5% CO₂ for 48 h. All conditions were tested in singlicates as low inter-well variability was previously demonstrated for the method.

Multicolour immunofluorescence was performed using the following panel of mouse anti-human monoclonal antibodies: PE-Cy5 conjugated anti-CD11c (clone B-ly6), FITC conjugated CD80 (clone L307.4), PE-Cy7 anti human CD83 (clone HB15e), PE conjugated CD86 (clone FUN-1) (all from Becton Dickinson) in combination with a viability dye (LIVE/DEAD fixable dead cell stain RED; Molecular Probes, Life Technologies). Negative controls were isotype matched control antibodies (Becton Dickinson).

Stimulated DCs were harvested by gentle scraping in the presence of cell dissociation buffer (Gibco, Life Technologies), washed in FACS buffer (PBS, 2% FCS, 2 mM EDTA and 0.05% Sodium Azide) and subsequently blocked in 100% FCS. 2.5×10^5 cells were stained with either the antibody or isotype control panel.

Following staining cells were resuspended in FACS buffer containing fixative [0.8% formaldehyde (Beckman Coulter)] for flow cytometry analysis.

Flow cytometry measurements were performed on an FC500MPL flow cytometer (Beckman Coulter). Cell debris were eliminated from the analysis by forward and side scatter gating and 10,000 viable CD11c+ cells were acquired using the MXP software (Becton Dickinson). Flow cytometry data for CD86 (MFI), CD80 (MFI), and CD83 (% positive cells) was analyzed using Kaluza Software (Becton Dickinson). Data are presented as the fold change over PBS treated control.

Quantitative Real Time RT-PCR Assay (qPCR) of Cytokines and Chemokines

Immature moDC were plated in 24-well cell culture plates at 1 mL per well (1×10^6 /well) and then stimulated with 10 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of native or aggregated antibodies for 6 or 24 h. Total RNA was extracted after lysis using the Nucleospin RNA kit (Macherey Nagel, Hoerd, France), according to the manufacturer's instructions. Total RNA pellets were resuspended in RNase-free water (60 μL) and quantified by spectrophotometry. First-strand cDNA was synthesized from total RNA by use of a thermocycler (Biometra, Gottingen, Germany). The reaction used 1 μg total RNA, a deoxynucleotide triphosphate mixture (containing 25 mM deoxy-adenosine triphosphate, deoxy-guanosine triphosphate, deoxy-cytidine triphosphate, and deoxy-thymidine triphosphate), and 50 mM oligo (dT) primers (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Reverse transcription was carried out in 1X AMV RT reaction buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) with RNase inhibitor (RNasine; Promega) at 40 U/ μl , AMV RT (Promega) at 10 U/ μl , and RNase-free water to a final volume of 10 μl . A control without RT was used to confirm the absence of DNA contamination. Real-time PCR was performed by use of the SYBR Green technology on a CFX96 system (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France). Each reaction mix consisted of 1:20 diluted cDNA in 4 μl nuclease-free water; 0.5 mM each forward and reverse primer for IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40, TNF- α , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10, GAPDH, β -actin (Table 1); and SsoAdvanced Supermix (Bio-Rad Laboratories) in a total reaction volume of 10 μl . After 30 s at 95°C for Sso7d-fusion polymerase activation, amplification was allowed to proceed for 44 cycles, each consisting of denaturation at 95°C for 5 s and annealing/extension at 62°C for 5 s. 7 fold serial dilutions of mixed cDNA (from different samples) were analyzed for each target gene, allowing us to construct linear standard curves from which the efficiency of each PCR run was evaluated. SYBR Green fluorescence was detected at the end of each elongation cycle, after which a melting curve was constructed to confirm the specificity of the PCR products. Quantification was performed with Bio-Rad Laboratories CFX Manager software, and data were analyzed with the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method. Ratios were calculated as the geometrical mean of $(1 + E)^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ values, where E is the efficiency, and $\Delta\Delta\text{Ct}$ is the target gene expression of treated cells compared with normal levels in untreated cells, with correction for the expression of the reference genes β actin and GAPDH. Results were expressed as the fold-factor induction [i.e., ratio of $(1 + E)^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ of treated cells/ $(1 + E)^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ of untreated cells].

Cytokine and Chemokine Quantification in Cell Culture Supernatants

Immature moDC were plated in 48-well flat bottom tissue culture plates (Falcon) with 400 μl per well (1×10^6 cells/ml) and then stimulated with 10 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of native or aggregated antibodies. After 48 h stimulation moDC culture supernatants were measured in duplicate for cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF- α , IFN- γ , and chemokines CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL-4 (MIP-1 β), and CXCL10

TABLE 1 | Forward and Reverse primers for q-PCR tested cytokines and chemokines.

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
IL-1 β	ACA GAC CTI CCA GGA GAA TG	GCA GTI CAG TGA TCG TAC AG
IL-6	TCA ATG AGG AGA CTI GCC TG	GAT GAG TIG TCA TGT CCT GC-3
IL-8	TCT CTI GGC AGC CTI CCA TGA	TGG GGT GGA AAG GTI TGG AG
IL-12p40	TGG AGT GCC AGG AGG ACA GT	TCT TGG GTG GGT CAG GTI TG
TNF- α	TCT TCT CGA ACC CCG AGT GA	CCT CTG ATG GCA CCA CCA G
CCL3	TCT GCA ACC AGT TCT CTG CAT CAC	ACT GGC TGC TCG TCT CAA AGT A
CCL4	CGC CTG CTG CTI TIC TIA CAC	GGT TIG GAA TAC CAC AGC TIG
CCL5	GCC CAC ATC AAG GAG TAT TIC TAC A	CGG TIC TTT CGG GTG ACA A
CXCL10	TCT AAG TGG CAT TCA AGG AGT ACC	AAA GAC CTI GGA TIA ACA GGT TGA
GAPDH	CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA	TGT CGT CAT GAG TCC TIC CA

(IP-10), using Meso Scale Discovery (MSD, Rockville, MA, USA) multiplex assay, following manufacturer's instructions.

Detection of Phosphoproteins Signaling Pathways

Cell lysates were obtained from immature moDC (2×10^6 cells/ml) plated at 100 μl /well in a 96 well round bottom plate treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of native antibodies or aggregates for 15 min or 30 min. Treated cells were washed in cold PBS then lysed for 5 min on ice with ice-cold 1 \times Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology, USA) plus Halt Protease and Phosphatase inhibitor (Pierce Protein Biology). Cell debris were removed by micro-centrifugation at max speed for 10 min at 4°C. According to manufacturer's instructions, samples were added to customized phospho signaling kit (Bio-Rad Laboratories) containing microbeads with antibodies against human Akt (Ser⁴⁷³), ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷ and Syk (Tyr³⁵²) phosphoproteins at 50 μl /well in 96 well assay plate (Greiner Bio-One). Data were acquired using Bio-Plex 200 system (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's recommended settings for phosphoprotein acquisition. Data values were normalized against reference control GAPDH, and sample values were divided by value for immature DC treated with media alone to achieve fold difference over baseline. Data were collected from 12 donors.

Statistical Analysis

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

RESULTS

Native or aggregated antibodies were used to evaluate their capacity to induce maturation of immature moDCs from healthy donors. To this end, moDC differentiation procedures were harmonized across four independent laboratories (Switzerland, France Germany and USA), and the same preparations -either of native or aggregated antibodies- were tested.

Four commercial antibodies (infliximab, rituximab, natalizumab, and adalimumab) were submitted to different stresses which could induce aggregates to be tested in the *in vitro* assays. Thus, shear stress and heat stress were tested, both with two increasing intensities, in order to assess potential dose-dependent effects of the formed particles. Antibody behavior under these stress conditions was rather different. Upon heat stress, infliximab and rituximab showed a fluffy aspect at the optical level, confirmed by a dramatic increase of the number of

subvisible aggregates that was dependent on the stress intensity. Adalimumab and natalizumab preparations remained clear and showed only a slight increase of subvisible particles, independent of intensity (data not shown). On the other hand, infliximab and rituximab showed moderate susceptibility to shear stress, with less subvisible particles compared to heat stress. Natalizumab was also sensitive to shear stress but to a lesser extent, whereas adalimumab did not show any susceptibility to this stress. Full characterization of the aggregation of these antibodies is described elsewhere (manuscript in preparation). To study moDC maturation, each site performed one of the following *in vitro* assays: (1) analysis of maturation and co-stimulatory membrane protein expression by flow cytometry, (2) the expression of cytokine and chemokine mRNA measured by real time quantitative PCR, (3) quantification of secreted cytokine and chemokine secretion, and (4) analysis of intracellular phosphoproteins involved in DC signaling pathways (Figure 1).

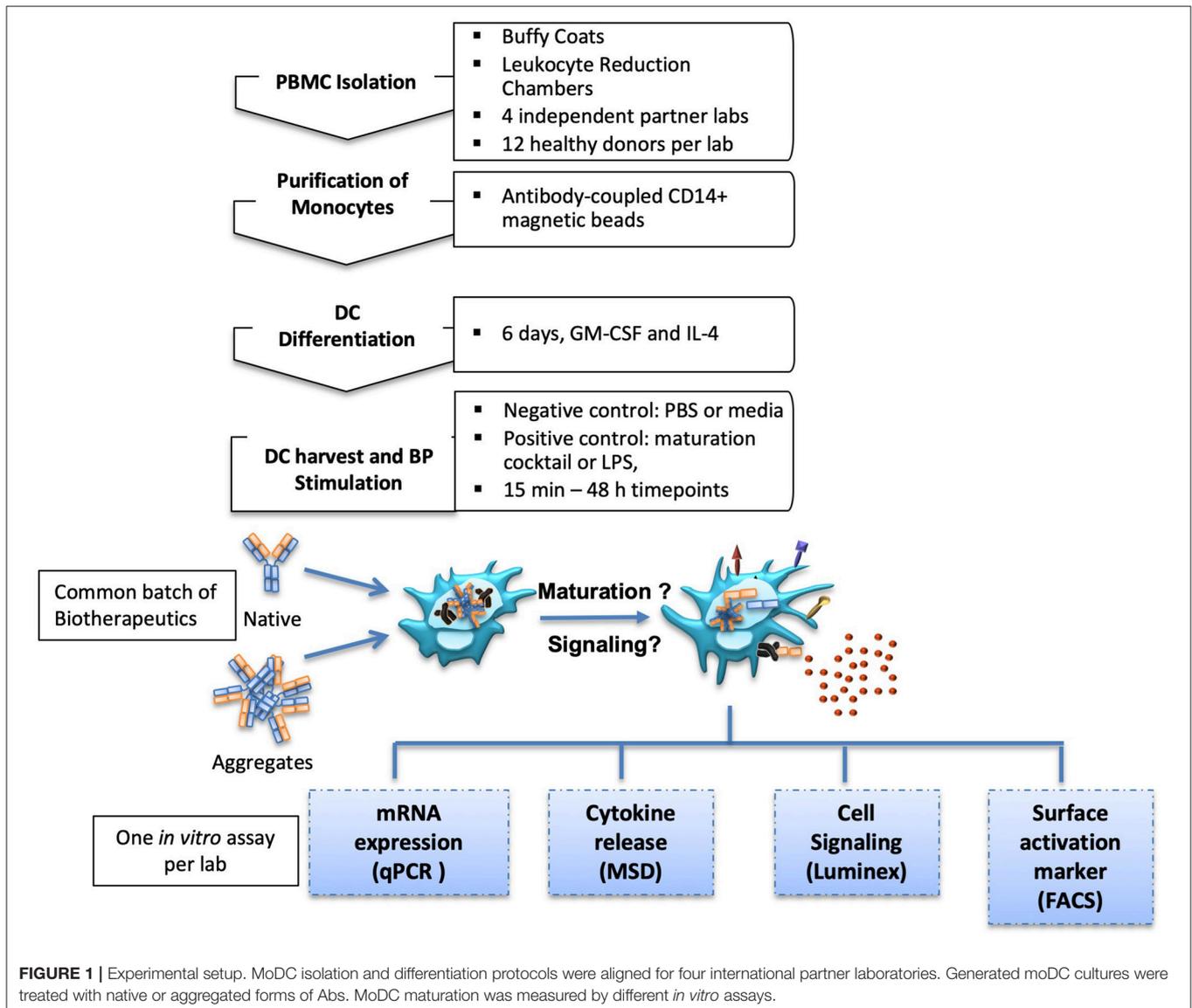
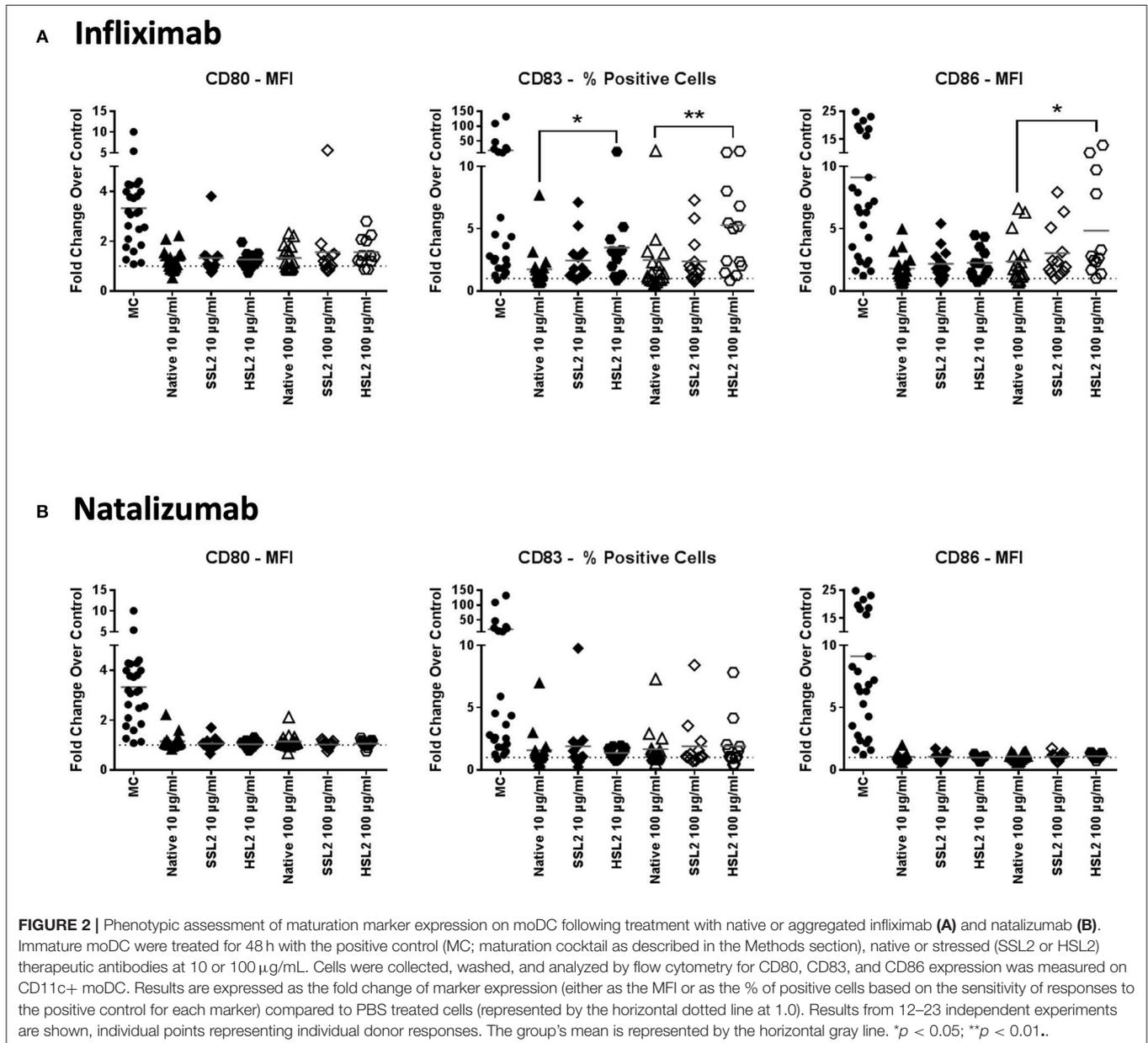


FIGURE 1 | Experimental setup. MoDC isolation and differentiation protocols were aligned for four international partner laboratories. Generated moDC cultures were treated with native or aggregated forms of Abs. MoDC maturation was measured by different *in vitro* assays.

Phenotypic moDC Maturation Measured by Flow Cytometry

Immature moDC were incubated with 10 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of native or aggregated antibodies for 48 h. The upregulation of the maturation marker CD83 and the CD4 T-cell co-stimulatory molecules CD80 and CD86 relative to PBS treated cells was determined by flow cytometry via the evaluation of the mean fluorescence intensity (for CD86 and CD80), and the percentage of positive cells (for CD83). These parameters were selected as they showed the greatest response to the maturation cocktail positive control determined as the fold change over PBS treated cells for each marker, (e.g., MFI vs. % positive cells: CD86: 8.81x vs. 1.72x; CD80: 3.32x vs. 3.30x; CD83: 4.97x vs. 18.35x). The maturation cocktail positive control resulted

in a significant upregulation of CD83, CD80, and CD86 in all tested donors when compared to the PBS treated control, however there was a significant inter-individual variability in this biological assay system (**Figure 2**). Treatment of immature moDCs with native antibodies induced only a slight increase in expression of all maturation markers, with fold changes over the PBS treated control remaining below 1.5 for all tested mAbs. Only infliximab treatment at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ increased both CD83 and CD86 expression (2.4 and 2.5-fold, respectively), although not statistically significant. No significant changes in surface marker expression were detected after treatment of immature moDCs with all SSL1 or SSL2 and HSL1 aggregated antibodies tested at any concentration (data for heat and shear stress level 1 not shown; SSL2 data in **Figure 2** and



Supplemental Figure 1). In contrast, a significant up-regulation of CD83 and CD86 was observed for HSL2 aggregated infliximab at 10 (CD83: $p = 0.0160$) and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CD83: $p = 0.0085$, and CD86: $p = 0.0329$; **Figure 2A**). Treatment of moDCs with all other HSL2 aggregated antibodies also led to no significant upregulation of maturation markers (**Figure 2** and **Supplemental Figure 1**). This lack of a statistically significant response was likely due to the high level of donor variation in this assay system.

Cytokine and Chemokine Transcripts Expression Measured by qPCR

MoDC maturation by antibodies and aggregates was also assessed by quantification of mRNA levels of several cytokines and chemokines, following 6 or 24 h of incubation. Native antibodies did not induce transcript upregulation. As expected, in the presence of LPS, the mRNA levels of all cytokines and chemokines were strongly up-regulated (**Figure 3**). Infliximab HSL2 aggregates induced a significant increase in IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α , 6 h after stimulation, showing concentration dependency, whereas IL-12p40 mRNA was increased 24 h after stimulation (**Figure 3**). Infliximab HSL2 aggregates also up-regulated CCL3 and CCL4 transcripts (**Figure 4**). In contrast, other infliximab aggregates (SSL2, HSL1, and SSL1) did not induce any transcript upregulation (data not shown). For natalizumab (**Figures 3, 4**), adalimumab, and rituximab (data not shown), none of the stressed materials induced significant transcript upregulation.

Quantification of Cytokines and Chemokines Release

The production of cytokines and chemokines was measured 48 h after moDC stimulation by antibodies and aggregates, to see if changes in gene transcription could be correlated at the protein level. Positive controls (LPS or maturation cocktail described in Materials and Methods section) gave high levels of all cytokines production. After stimulation with infliximab HSL2 aggregates (10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), significant increases of IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α were observed compared to the native mAb (**Figure 5A**; data per donor are reported in **Supplemental Table 1**), that were consistent with the up-regulation of mRNA observed by q-PCR measurements. Moreover, there was a trend for IL-12p70 up-regulation (10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), that can be correlated with the later increase of transcripts at 24 h after stimulation. Regarding chemokine production, infliximab HSL2 aggregates induced CCL3 and CCL4 up-regulation at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figure 6A**; data per donor are reported in **Supplemental Table 3A**), that was as well consistent with q-PCR measurements of mRNA counterparts. In contrast, other infliximab aggregates (SSL2, HSL1, and SSL1) did not induce any cytokine or chemokine production (data not shown). For natalizumab (**Figures 5B, 6B**; data per donor are reported in **Supplemental Tables 2,3B**),

adalimumab, and rituximab (data not shown), none of the stressed materials induced significant secretions.

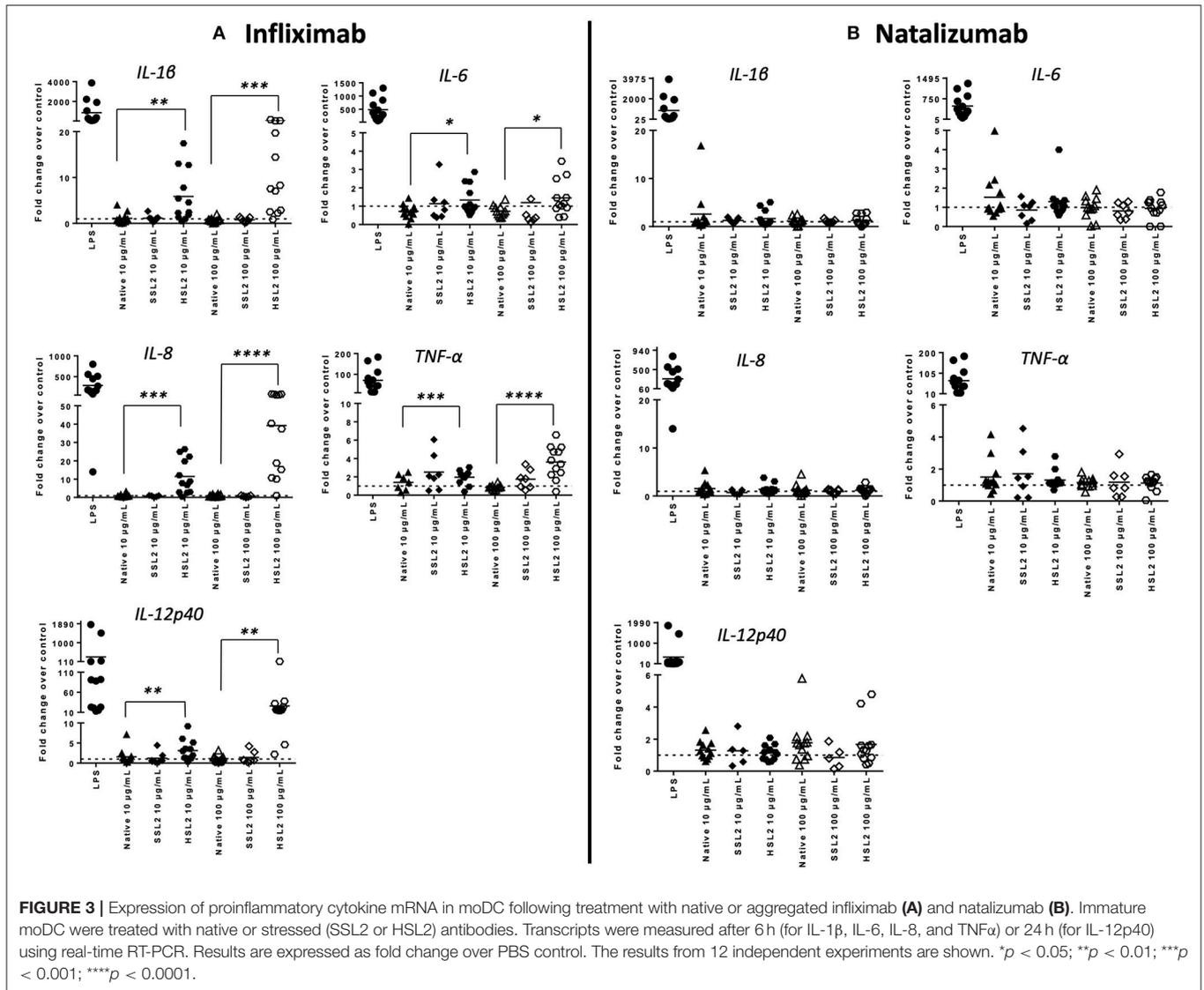
Taken together, our results showed that aggregated mAbs, in particular heat-stressed infliximab, increased cytokine, and chemokine production, both at the mRNA and protein level.

Phosphoproteins Involved in moDC Signaling Pathways

In order to study the effect of mAbs and aggregates on phosphoproteins, we looked at the following signaling molecules that potentially play a role in DC activation: Akt (Ser⁴⁷³), ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, Thr¹⁸⁵/Tyr¹⁸⁷), and Syk (Tyr³⁵²). As expected, moDC treatment with the maturation cocktail resulted in all tested proteins phosphorylation except Syk. Our results show that heat-induced aggregates of infliximab (HSL2) significantly induced phosphorylation of Syk and Akt, at 15 and 30 min of treatment, and phosphorylation of ERK1/2, at 30 min of treatment (**Figures 7A–C**). The effect of infliximab on immature moDC seemed concentration dependent (**Supplemental Figure 2**). In contrast, no significant signaling activity was observed for natalizumab treatment (**Figures 7A–C**), neither for rituximab nor adalimumab treatments (**Supplemental Figure 2**).

DISCUSSION

The presence of aggregates in biotherapeutics has been correlated with ADA development in patients and many efforts are currently ongoing in an attempt to dissect the cellular mechanisms involved in immunogenicity. The aim of this study was to optimize *in vitro* methods to evaluate the potential of therapeutic antibodies and aggregated preparations on therapeutic antibodies to induce DC maturation, as these professional antigen-presenting cells have a pivotal role in triggering adaptive immune responses that would *in fine* lead to ADA production (27). Our approach was to test the impact of four therapeutic antibodies and aggregated formats created using physical stress using different assay methods performed by independent laboratories to establish robust readouts of dendritic cell maturation that could be used to monitor bioproduct preparations during the drug discovery process. To do so we first focused on the inter-site alignment of protocols to obtain a common model of moDCs, so that we could measure the up-regulation of moDC activation markers, using either a maturation cocktail of cytokines or LPS, conditions that were then kept as positive controls for further experiments. The four therapeutic antibodies that were chosen for this study are classically used to treat multiple sclerosis and inflammatory diseases and are under evaluation for their immunogenicity potential by the ABIRISK consortium (36). First, two types of physical stress, heat and shear, were compared. As stated, the results showed different behaviors between stressed antibody materials. Although the aggregation process has been extensively studied for antibodies, only few studies showed comparison between identified monoclonal antibodies submitted to the same stress (34, 37). Our work demonstrated that infliximab and rituximab showed the highest



capacity to aggregate under heat stress conditions with a fluffy visual aspect. This observation could be expected regarding the chimeric status of these antibodies, that may be less stable than natalizumab (humanized) or adalimumab (fully human). However, the propensity to aggregation also depends on the stress condition, as shear stress had less effect on aggregation for the chimeric antibodies. This suggests that other factors, as intrinsic physical and chemical properties take place in the aggregation process.

Then we assessed the discriminatory potential of the cell assays. The overall results generated by independent sites and orthogonal readouts were in correlation and support the use of these assays to investigate the intrinsic capacity of therapeutic antibodies to activate DCs, allow ranking of the tested compounds and evaluating the impact of formulation effects on responses. Indeed infliximab, that had the highest propensity to form aggregates with heat stress, induced a

marked activation of moDC as measured by an increase in surface maturation marker expression (CD83 and CD86), cytokine/chemokine transcript upregulation and release (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70 and TNF- α , CCL3 and CCL4) and intracellular signaling protein phosphorylation (Syk, ERK1/2, and Akt). In contrast, natalizumab which does not aggregate under the same heat stress conditions did not induce any moDC activation in any assay read-out, whereas rituximab and adalimumab that showed a less susceptibility to heat stress could show some marker up regulation (e.g., CD80 for adalimumab, Syk and ERK for rituximab). In view of these results only heat stress (but not shear stress) aggregated infliximab induced a full maturation of moDC regarding membrane expression of activation proteins and cytokine secretion. Indeed, these two features (together with antigen presentation), are known to be necessary to induce naïve cell activation (38, 39). Both CD83 and CD86 up-regulation have been observed in studies

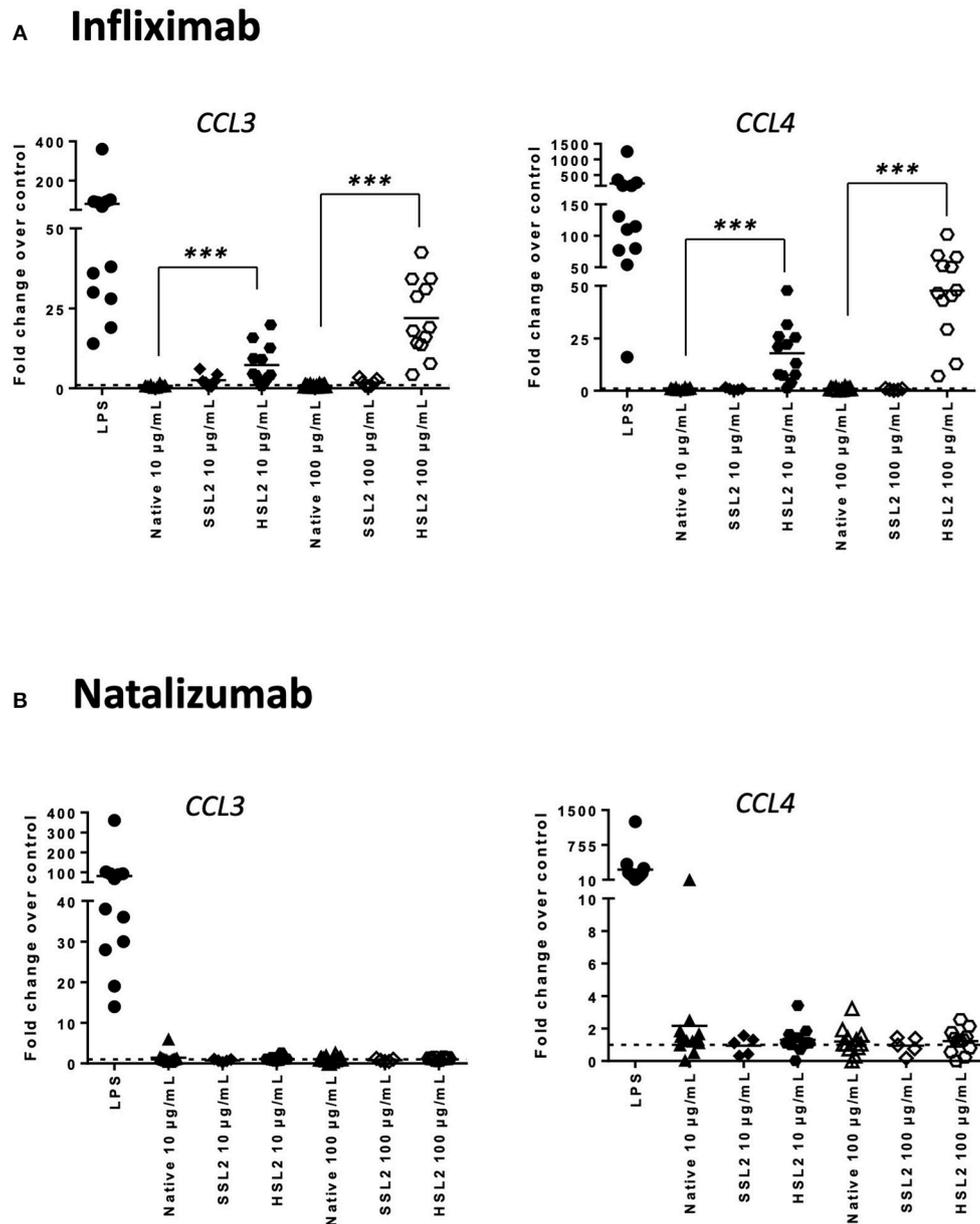
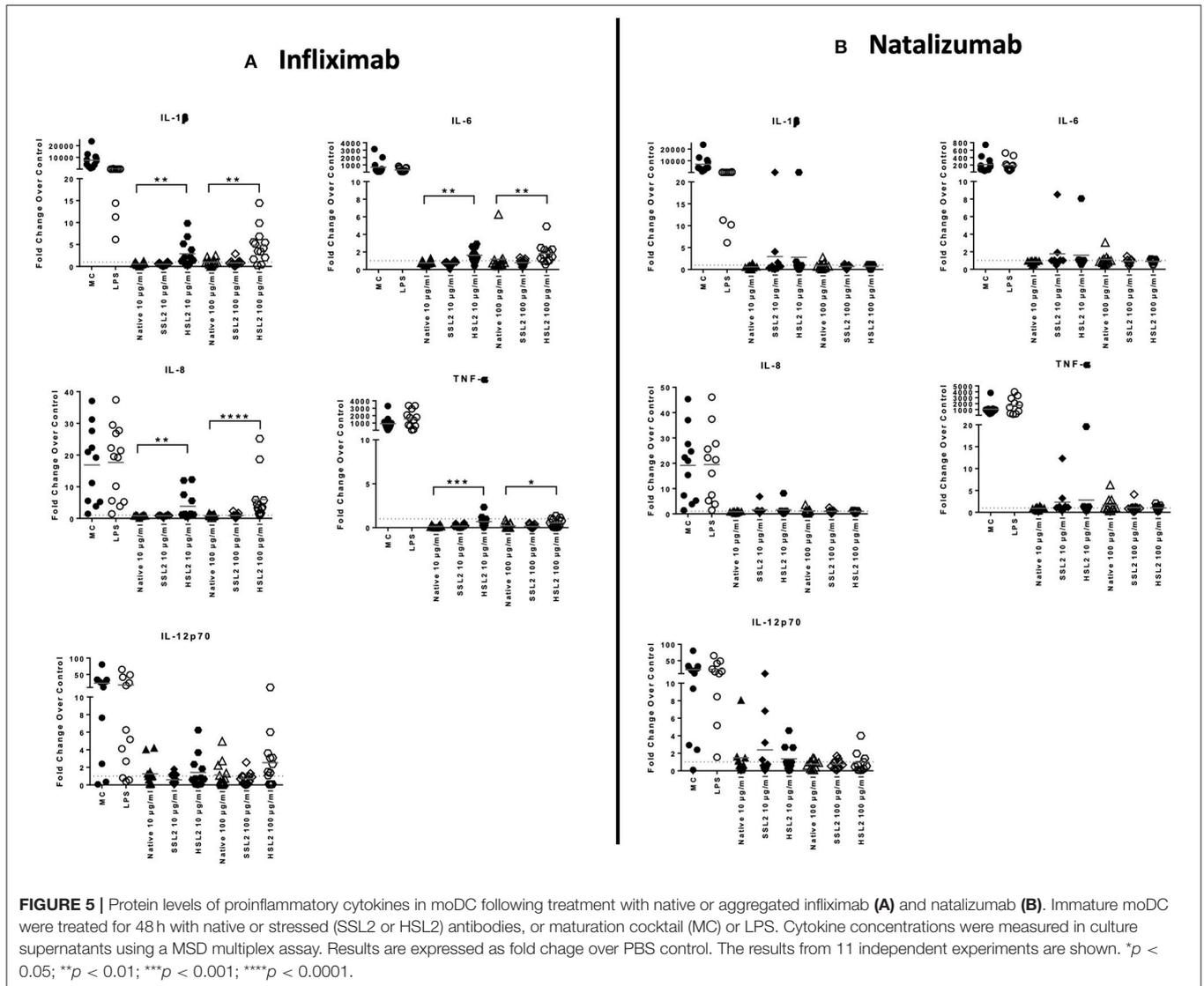


FIGURE 4 | Expression of chemokines CCL3 and CCL4 mRNA in moDC treated with native or aggregated infliximab (A) and natalizumab (B). Immature moDC were treated with native or stressed (SSL2 or HSL2) antibodies. Transcript expression was measured after 6 h using real-time RT-PCR. Results are expressed as fold change over PBS control. The results from 12 independent experiments are shown. *** $p < 0.001$.

evaluating the impact of aggregated antibodies on DCs (33–35) with the expression increase dependent on the nature and the force of the stress condition and correlate with the extent of aggregation in the antibody preparations. Regarding the cytokine release, the identified signature is in favor of a DC1 (inflammatory) phenotype, and in agreement with the one already found (35), again depending on the applied stress. In particular, a stir-stressed rituximab preparation induced more cytokine release than heat or shear stressed preparations, using the same moDC stimulation protocol and subsequent cytokine

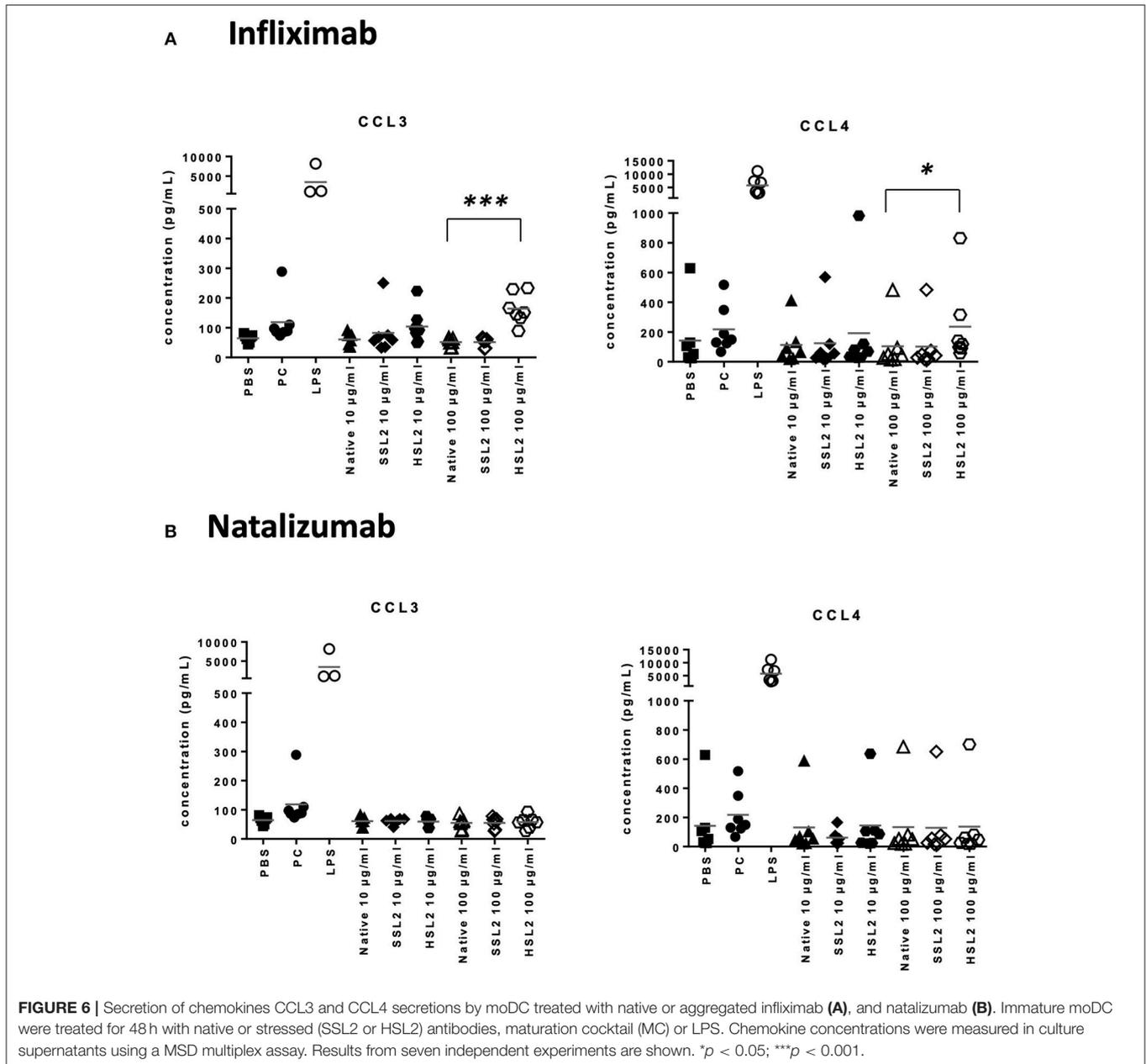
quantification (35), whereas another stir-aggregated rituximab preparation did not induce any cytokine up regulation (34). Besides, in a PBMC *in vitro* model, the early cytokines induced by stir-aggregated antibodies highlighted the predominant response of monocytes, as IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , CCL2, CCL3, and CCL4 were among the most up-regulated (32, 40). Our results along with those found in the literature (32, 33, 40) tend to demonstrate that the magnitude and pattern of cellular responses correlate with the specific nature of the aggregates they interact with.



The moDC extra-cellular responses were complemented here for the first time by intracellular investigations into aggregate-induced signaling pathway activation. In the case of antibodies, Syk recruitment suggests the engagement of Fc receptors by native or aggregated forms (41). The engagement of Fc γ RI and Fc γ RIII by antibody aggregates and their impact on cytokine secretion have been demonstrated in a PBMC *in vitro* model (32). However, *in vitro* generated moDC mostly express Fc γ RII receptor (28), that seem to be less involved in aggregate-mediated signaling to induce cytokine release (32). We hypothesize that the Syk phosphorylation observed when moDC were treated with infliximab HSL2 could also be likely through the C-type lectin receptors. Indeed it has been described that agonists against Dectin-1 trigger Syk and ERK phosphorylation and induced DC maturation and the secretion of proinflammatory cytokines, including IL-6, TNF- α , and IL-23, but little IL-12 (42, 43). This is consistent with our cytokine data, where significant IL-6, TNF- α , and IL-12p40 transcripts were observed. While IL-12p40 is involved in both IL-12 and IL-23 production, IL-12p70 is

involved in specifically IL-12 production (44). Since significant increase in IL-12p40 was observed in qPCR with limited IL-12p70 production in the MSD assay, this suggests that IL-23 is likely produced in addition to IL-12. Alternatively, it has been shown that Syk is also linked to DC-SIGN engagement, which rather modulates DC maturation through ERK and Akt activation, leading to the down regulation of cytokine production (45). Moreover, other studies showed that ERK and Akt phosphorylation modulate the effects of TLR-4 engagement by LPS, leading to a limited expression of inflammatory cytokines, including IL-12p70 (46, 47). Yet, TLR-4 was also shown to be engaged by antibody aggregates (32). In total, our results are in frame with the hypothesis that aggregates can have antibody-specific interaction with DCs through Fc receptors but may also act as danger signals interacting with many different pattern recognition receptors, that could lead to the activation of various signaling pathways.

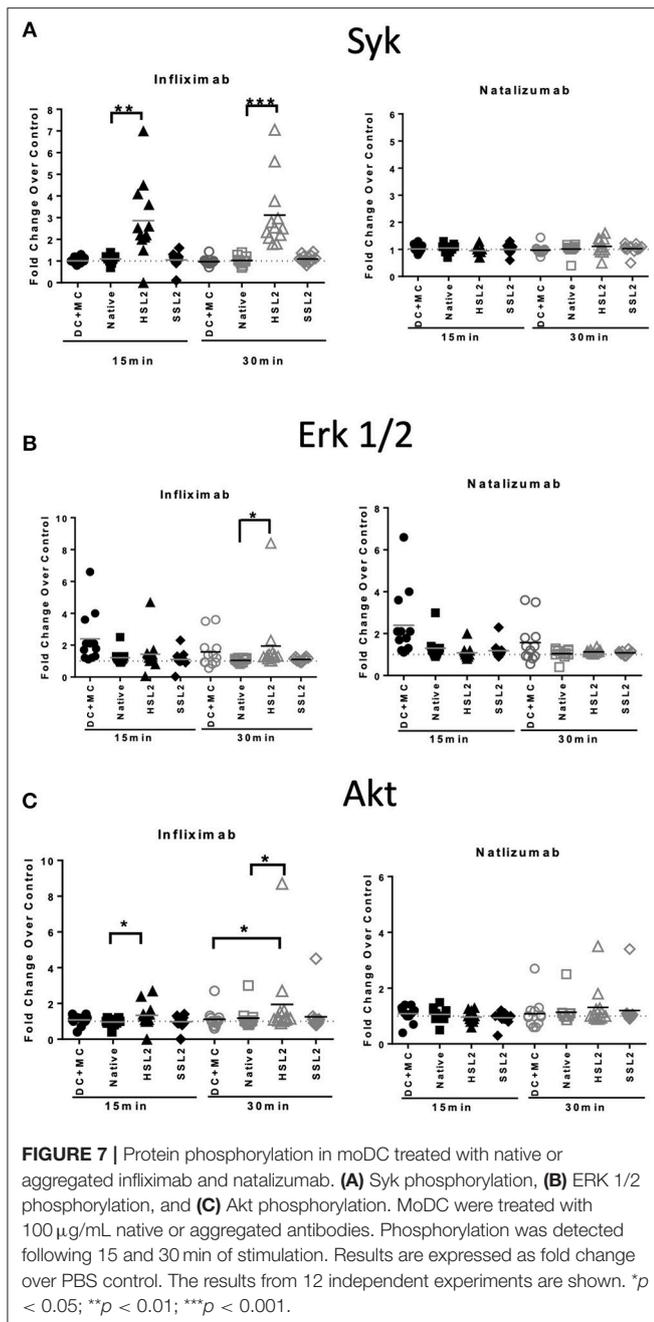
The capacity of the different antibody aggregates to induce moDC maturation may be explained in different ways. The



most evident is the propensity of the protein to aggregation, as evidenced by the comparison between infliximab and natalizumab. Indeed, a recent study of the crystal structure of infliximab revealed a reversible self-association interface in the Fab domain (48), that could favor aggregation under stress conditions. This observation could explain that in our study aggregated preparations of infliximab showed greater number of microparticles than the other aggregated antibody preparations (manuscript in preparation). Besides, it has been demonstrated that particles around 5–10 μm size were better able to activate PBMC than nano-sized particles (40). Another explanation could be related to the capacity of aggregates to interact with different receptors on moDC, as our results showed that different antibody

preparations induce differential intracellular signaling pathways and subsequent cellular responses. Differential processing of aggregated antibodies has already been demonstrated, and showed that HLA-DR associated peptides were different between two different aggregated antibodies (33). The comparison of the clusters of HLA-DR presented peptides between the four antibodies tested in this study is currently under investigation (manuscript in preparation).

Several *in vitro* assays are currently in use to understand the impact of product-related factors and impurities on therapeutic antibody induced immunogenicity—reviewed in Brennan et al. (49). The impact of aggregated antibodies on the development of immune responses have been assessed using DC maturation



assays (33–35), or evaluating naïve T-cell activation, either in a total PBMC culture model (32, 34, 37) or in a DC/T cell co-culture model (33, 35). Globally, all assays have shown that cellular activation is increased by aggregated preparations compared with the native products. Since tested aggregated preparations contained a greater number of particles than commercial native products, it would be of interest to determine a threshold of particle numbers that is sufficient to induce cellular activation to determine the assay sensitivity. The advantage of the DC maturation assays described here is that they may be used to compare large numbers of aggregated preparations -including

different aggregation states- with the same donor, which may be interesting during early stages of BP development. The question to answer would then be whether a given form of aggregates (or a given percentage) could have the potential to induce an immune response starting with DC activation. For this purpose, the use of a single or two orthogonal read outs such as membrane activation markers and/or cytokine release would be sufficient, while the qPCR method could be used as a first screen to identify the cytokines to be quantified. Indeed, such assays could help in the selection of antibody candidates. On the other hand, the use of the signaling assay brings information to determinate the molecular mechanisms that lead to DC maturation. This is a valuable tool to gain insight into the intra-cellular pathways that are directly activated by aggregates, which are not fully understood. So, better than a screening application, this kind of assay is more dedicated to collect information to improve our understanding on DC-aggregates interaction and behavior.

In conclusion, the use of DC activation assays is useful for screening during the development phase of therapeutic antibodies for the compound's intrinsic capacity, including formulation related properties such as aggregation that may increase the risk of inducing an immune response. The extrapolation to predict the immunogenic risk of bioproducts at the clinical stage is not sufficient, as there are other influencing factors either related to patients or to the concomitant treatments (14, 50). However, it can be noted that infliximab, which has the greatest propensity to aggregate *in vitro* is one of the most immunogenic in clinical practice (6, 8). If the chimeric status of an antibody (e.g., infliximab or rituximab) can certainly be correlated to aggregation propensity and immunogenicity, this correlation seems more difficult to establish regarding humanized and fully human antibodies. Indeed adalimumab (fully human) is described as more immunogenic than natalizumab (humanized), although both antibodies are poorly susceptible to aggregation.

Nevertheless, these assays are a valuable tool to assess the cellular mechanisms that drive DC activation by aggregated proteins. Thus, we offer these optimized *in vitro* assays for mAb evaluation in particular in terms of immunogenicity driven by DC.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IT, HM, S-YT, and PB wrote the paper. YG, MN, ML, NS, SR, ZG, CZ, JL, and MY performed the assays. CZ, AK, H-WV, FA, and MP reviewed the paper.

FUNDING

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

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank Claudine Deloménie from the IPSIT Transcriptomic and Proteomic Platform (TRANSPROT) for advice regarding quantitative real-time PCR.

REFERENCES

- Baker MP, Reynolds HM, Lumicisi B, Bryson CJ. Immunogenicity of protein therapeutics: the key causes, consequences and challenges. *Self Nonself*. (2010) 1:314–22. doi: 10.4161/self.1.4.13904
- Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Publishing Group*. (2010) 9:325–38. doi: 10.1038/nrd3003
- Baudouin V, Crusiaux A, Haddad E, Schandene L, Goldman M, Loirat C, et al. Anaphylactic shock caused by immunoglobulin e sensitization after retreatment with the chimeric anti - interleukin-2 receptor monoclonal antibody. *Transplantation*. (2003) 76:459–63. doi: 10.1097/01.TP.0000073809.65502.8F
- Vultaggio A, Matucci A, Nencini F, Pratesi S, Parronchi P, Rossi O, et al. Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions. *Allergy*. (2010) 65:657–61. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02280.x
- Vultaggio A, Matucci A, Nencini F, Pratesi S, Petroni G, Cammelli D, et al. Drug-specific Th2 cells and IgE antibodies in a patient with anaphylaxis to rituximab. *Int Arch Allergy Immunol*. (2012) 159:321–26. doi: 10.1159/000336839
- Vincent FB, Morand EF, Murphy K, Mackay F, Mariette X, Marcelli C. Antidrug Antibodies (ADAb) to Tumour Necrosis Factor (TNF) specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases : a real issue, a clinical perspective. *Ann Rheum Dis*. (2013) 72:165–78. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202545
- Thurlings RM, Teng O, Vos K, Gerlag DM, Aarden L, Stapel SO, et al. Clinical response, pharmacokinetics, development of human anti-chimaeric antibodies, and synovial tissue response to rituximab treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. (2010) 69:409–12. doi: 10.1136/ard.2009.109041
- Arstikyte I, Kapleryte G, Butrimiene I, Venalis A. Influence of immunogenicity on the efficacy of long-term treatment with TNF α ? Blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Biomed Res Int*. (2015) 2015:604872. doi: 10.1155/2015/604872
- Bartelds GM, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JW, et al. Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-Up. *JAMA*. (2011) 305:1460–68. doi: 10.1001/jama.2011.406
- Bodini G, Giannini EG, Savarino V, Del Nero L, Pellegatta G, De Maria C, et al. Adalimumab trough serum levels and anti- adalimumab antibodies in the long-term clinical outcome of patients with crohn' s disease. *Scand J Gastroenterol*. (2016) 51:1081–6
- Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue E-W, et al. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. (2006) 354:911–23. doi: 10.1056/NEJMoa044396
- Calabresi PA, Giovannoni G, Confavreux C, Galetta SL, Havrdova E, Hutchinson M, et al. The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology*. (2007) 69:1391–403. doi: 10.1212/01.wnl.0000277457.17420.b5
- Hermeling S, Crommelin DJ, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharma. Res*. (2004) 21:897–903. doi: 10.1023/B:PHAM.0000029275.41323.a6
- Nechansky A, Kircheis R. Immunogenicity of therapeutics: a matter of efficacy and safety. *Expert Opin Drug Discov*. (2010) 5:1067–79. doi: 10.1517/17460441.2010.514326
- Singh SK. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci*. (2011) 100:354–87. doi: 10.1002/jps.22276
- Wang W, Singh SK, Li N, Toler MR, King KR, Nema S. Immunogenicity of protein aggregates — concerns and realities. *Int J Pharm*. (2012) 431:1–11. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.040
- Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation. *J Immunotoxicol*. (2013) 11:99–109. doi: 10.3109/1547691X.2013.821564
- Wang W, Nema S, Teagarden D. Protein aggregation—pathways and influencing factors. *Int J Pharm*. (2010) 390:89–99. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.02.025
- Vázquez-Rey M, Lang DA. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol Bioeng*. (2011) 108:1494–508. doi: 10.1002/bit.23155
- Roberts CJ. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol*. (2014) 32:372–80. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.05.005
- Fathallah AM, Bankert RB, Balu-Iyer SV. Immunogenicity of subcutaneously administered therapeutic proteins—a mechanistic perspective. *AAPS J*. (2013) 15:897–900. doi: 10.1208/s12248-013-9510-6
- Pardeshi NN, Qi W, Dahl K, Caplan L, Carpenter JF. Microparticles and nanoparticles delivered in intravenous saline and in an intravenous solution of a therapeutic antibody product. *J Pharm Sci*. (2017) 106:511–20. doi: 10.1016/j.xphs.2016.09.028
- Freitag AJ, Shomali M, Michalakos S, Biel M, Siedler M, Kaymakcalan Z, et al. Investigation of the immunogenicity of different types of aggregates of a murine monoclonal antibody in mice. *Pharm Res*. (2015) 32:430–44. doi: 10.1007/s11095-014-1472-6
- Filipe V, Poole R, Oladunjoye O, Braeckmans K, Jiskoot W. Detection and characterization of subvisible aggregates of monoclonal IgG in serum. *Pharm Res*. (2012) 29:2202–12. doi: 10.1007/s11095-012-0749-x
- Bessa J, Boeckle S, Beck H, Buckel T, Schlicht S, Ebeling M, et al. The immunogenicity of antibody aggregates in a novel transgenic mouse model. *Pharm Res*. (2015) 32:344–59. doi: 10.1007/s11095-015-1627-0
- Jiskoot W, Kijanka G, Randolph TW, Carpenter JF, Koulov AV, Mahler HC, et al. Mouse models for assessing protein immunogenicity: lessons and challenges. *J Pharm Sci*. (2016) 105:1567–75. doi: 10.1016/j.xphs.2016.02.031
- Moussa EM, Panchal JB, Moorthy BS, Blum JS, Joubert MK, Narhi LO, et al. Immunogenicity of therapeutic protein aggregates. *J Pharm Sci*. (2016) 105:417–30. doi: 10.1016/j.xphs.2015.11.002
- Guilliams M, Bruhns P, Saeys Y, Hammad H, Lambrecht BN. The function of Fc γ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nat Rev Immunol*. (2014) 14:94–108. doi: 10.1038/nri3582
- Muzio M, Bosio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. No title differential expression and regulation of Toll-like Receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*. (2000) 164:5998–6004. doi: 10.4049/jimmunol.164.11.5998
- Bajtay Z, Csomor E, Sándor N, Erdei A. Expression and role of Fc- and complement-receptors on human dendritic cells. *Immunol Lett*. (2006) 104:46–52. doi: 10.1016/j.imlet.2005.11.023
- Luo Y, Zhaojiang L, Stephen WR, Clifford E, Bruce T. Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher *in vitro* binding affinities to Fc γ receptors. *MAbs*. (2009) 1:491–504. doi: 10.4161/mabs.1.5.9631
- Joubert MK, Hokom M, Eakin C, Zhou L, Deshpande M, Baker MP, et al. Highly aggregated antibody therapeutics can enhance the *in vitro* innate and late-stage T-cell immune responses. *J Biol Chem*. (2012) 287:25266–79. doi: 10.1074/jbc.M111.330902
- Rombach-Riegraf V, Karle AC, Wolf B, Sordé L, Koepke S, Gottlieb S, et al. Aggregation of human recombinant monoclonal antibodies influences the capacity of dendritic cells to stimulate adaptive T-cell responses *in vitro* *PLoS ONE*. (2014) 9:e86322. doi: 10.1371/journal.pone.0086322

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00601/full#supplementary-material>

34. Ahmadi M, Bryson CJ, Cloake EA, Welch K, Filipe V, Romeijn S, et al. Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics. *Pharm Res Oct.* (2014) 32:1383–94. doi: 10.1007/s11095-014-1541-x
35. Gallais Y, Szely N, Legrand FX, Leroy A, Pallardy M, Turbica I. Effect of growth hormone and IgG aggregates on dendritic cells activation and T-cells polarization. *Immunol. Cell Biol.* (2016) 95:306–15. doi: 10.1038/icb.2016.100
36. Jensen PEH, Warnke C, Ingenhoven K, Piccoli L, Gasis M, Hermanrud C, et al. Detection and kinetics of persistent neutralizing anti-interferon-beta antibodies in patients with multiple sclerosis. Results from the ABIRISK prospective cohort study. *J Neuroimmunol.* (2019) 326:19–27. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.11.002
37. Joubert MK, Deshpande M, Yang J, Reynolds H, Bryson C, Fogg M, et al. Use of *in vitro* assays to assess immunogenicity risk of antibody-based biotherapeutics. *PLoS ONE.* 11:e0159328. doi: 10.1371/journal.pone.0159328
38. Walsh KP, Mills KH. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol.* (2013) 34:521–30. doi: 10.1016/j.it.2013.07.006
39. Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev.* (2009) 227:234–47. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x
40. Telikepalli S, Shinogle HE, Thapa PS, Kim JH, Deshpande M, Jawa V, et al. Physical characterization and *in vitro* biological impact of highly aggregated antibodies separated into size-enriched populations by fluorescence-activated cell sorting. *J Pharm Sci.* (2015) 104:1575–91. doi: 10.1002/jps.24379
41. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* (2008) 8:34–47. doi: 10.1038/nri2206
42. Reis e Sousa C. 2011 ESCI award for excellence in basic/translational research: innate regulation of adaptive immunity by dendritic cells. *Eur J Clin Invest.* (2011) 41:907–16. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02541.x
43. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce Interleukin 17. *Nat Immunol.* (2007) 8:630–38. doi: 10.1038/ni1460
44. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol.* (2012) 13:722–28. doi: 10.1038/ni.2366
45. Caparrós E, Munoz P, Sierra-Filardi E, Serrano-Gómez D, Puig-Kröger A, Rodríguez-Fernández JL, et al. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood.* (2006) 107:3950–58. doi: 10.1182/blood-2005-03-1252
46. Nakahara T, Moroi Y, Uchi H, Furue M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci.* (2006) 42:1–11. doi: 10.1016/j.jdermsci.2005.11.004
47. Guha M, Mackman N. The Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem.* (2002) 277:32124–32. doi: 10.1074/jbc.M203298200
48. Lerch TE, Sharpe P, Mayclin SJ, Edwards TE, Lee E, Conlon HD, et al. Infliximab crystal structures reveal insights into self-association. *MAbs.* (2017) 9:874–83. doi: 10.1080/19420862.2017.1320463
49. Brennan FR, Morton LD, Spindeldreher S, Kiessling A, Allenspach R, Hey A, et al. Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *MAbs.* (2010) 2:233–55. doi: 10.4161/mabs.2.3.11782
50. Krieckaert C, Rispens T, Wolbink G. Immunogenicity of biological therapeutics: from assay to patient. *Curr Opin Rheumatol.* (2012) 24:306–11. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283521c4e

Conflict of Interest Statement: HM, ZG, SR, and AK are currently or were previously employed by Novartis. S-YT, JL, MY, FA, ML, PB, CZ, and H-WV are currently or were previously employed by Bayer.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed

Copyright © 2019 Morgan, Tseng, Gallais, Leineweber, Buchmann, Riccardi, Nabhan, Lo, Gani, Szely, Zhu, Yang, Kiessling, Vohr, Pallardy, Aswad and Turbica. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe III

IL-27 Production and Regulation in Human Dendritic Cells Treated with the Chemical Sensitizer NiSO₄.

Rami Bechara, Myriam Nabhan, Diane Antonios, Hayat Azouri, and Marc Pallardy

Chemical Research in Toxicology. 2018;31(12):1323-1331.

Titre : Agrégation et immunisation contre les protéines thérapeutiques : étude de la maturation des cellules dendritiques et de la réponse lymphocytaire

Mots clés : Protéines thérapeutiques, immunogénicité, cellules dendritiques, lymphocytes T

Résumé : L'immunogénicité des biothérapies constitue une limitation majeure au traitement des patients atteints de maladies chroniques et se traduit par la production d'anticorps dirigés contre le biomédicament (*anti-drug antibodies*, ADA). La détection d'ADA de haute affinité et d'isotypes divers chez les patients suggère la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative classique orchestrée par les cellules dendritiques. Par ailleurs, la présence d'agrégats protéiques dans les spécialités administrées serait un des facteurs favorisant l'immunogénicité, ces agrégats pouvant jouer le rôle de signal de danger.

L'objectif de notre travail était de mieux comprendre les interactions des agrégats de protéines avec les cellules dendritiques et les lymphocytes T aboutissant au déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique nécessaire à la production d'ADA.

Dans un premier temps, nous avons montré que des agrégats d'infliximab, anticorps monoclonal anti-TNF α , induisaient la maturation de cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes (moDC). Celle-ci se traduit par l'augmentation de l'expression de marqueurs membranaires d'activation et de costimulation et la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Nous avons également montré que ces modifications phénotypiques induites par les agrégats

favorisaient la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ et la production de cytokines. Par la suite, nous avons décrit les mécanismes cellulaires précoces impliqués dans l'activation de ces cellules en montrant que la neutralisation du récepteur Fc γ RIIa et de la tyrosine kinase Syk inhibait la maturation des moDC ainsi que l'activation des lymphocytes T CD4⁺.

Par ailleurs, nous avons évalué le rôle des agrégats d'infliximab dans la génération de néo-épitopes, en mettant en évidence l'existence d'un répertoire de lymphocytes T CD4⁺ naïfs reconnaissant les agrégats d'infliximab, chez le sujet sain. Ainsi, grâce à des préparations d'agrégats bien caractérisées et d'un modèle de co-cultures autologues de lymphocytes T CD4⁺ naïfs et de moDC chargées avec les agrégats, nous avons montré que la fréquence de LT CD4⁺ naïfs spécifiques des agrégats d'infliximab est plus importante que celle retrouvée pour l'anticorps natif. Ces résultats suggèrent une présentation accrue d'épitopes et de néo-épitopes dérivant des agrégats d'infliximab.

In fine, ce travail contribue à une meilleure compréhension des conséquences biologiques de l'agrégation des protéines à visée thérapeutique sur le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative spécifique en mettant l'accent sur les rôles adjuvant et antigénique des agrégats protéiques.

Title: Protein aggregation and immunization: study of dendritic cells and T-cell response

Keywords: Therapeutic protein, immunogenicity, dendritic cells, T cells

Abstract: Immunogenicity of biotherapeutic proteins is a major drawback in the treatment of patients with chronic diseases characterized by the production of anti-drug antibodies (ADA). The detection of ADA with high affinity and of various isotypes suggests a CD4 T cell-dependent adaptive immune response with a pivotal role for dendritic cells. Among other factors, the presence of protein aggregates in the administered products can promote immunogenicity, as aggregates seem to act as danger signals.

The aim of our work is to better understand the interactions of protein aggregates with dendritic cells and T cells, leading to the establishment of a specific adaptive immune response needed for the production of ADA.

We first showed that aggregation of infliximab, a monoclonal anti-TNF α antibody, induced the maturation of human monocyte-derived dendritic cells (moDC) via an increase in the expression of activation and costimulatory surface markers and the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines. Moreover, we showed that these phenotypic changes induced by aggregates promote CD4 T-cell proliferation and cytokine production.

Subsequently, we described the early events involved in moDC and T-cell response by showing that the neutralization of the Fc γ RIIa receptor and the tyrosine kinase Syk inhibited moDC maturation and CD4 T-cell activation.

Furthermore, we evaluated the involvement of infliximab aggregates in the generation of neo-epitopes by identifying a naïve CD4 T-cell repertoire recognizing infliximab aggregates in healthy subjects. By testing well characterized aggregate preparations and using an autologous co-culture model of naïve CD4 T cells and moDC loaded with aggregates, we showed that the frequency of naïve CD4 T cells specific for infliximab aggregates was higher than the one found for the native antibody. These results suggested an increased presentation of epitopes and neo-epitopes derived from infliximab aggregates.

In resume, our work contributes to a better understanding of the biological consequences of therapeutic protein aggregation on the onset of the specific adaptive immune response by focusing on the adjuvant and antigenic role of protein aggregates.

