



HAL
open science

Transfert materno-foetal de protéines thérapeutiques par des IgGs modifiées et induction de tolérance immunitaire

Angelina Mimoun

► **To cite this version:**

Angelina Mimoun. Transfert materno-foetal de protéines thérapeutiques par des IgGs modifiées et induction de tolérance immunitaire. Immunologie. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS424 . tel-04002095

HAL Id: tel-04002095

<https://theses.hal.science/tel-04002095>

Submitted on 23 Feb 2023

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.

Sorbonne Université

ED394 : Physiologie, Physiopathologies et Thérapeutiques

UMRS 1138 Immunopathologies et immuno-interventions thérapeutiques

Transfert materno-fœtal de protéines thérapeutiques par des IgGs modifiées et induction de tolérance immunitaire

Soutenue le 7 décembre 2022

Pour l'obtention du titre de Docteur de Sorbonne Université

Par Angelina Mimoun

Devant le jury composé de :

Professeur Bertrand Bellier, Sorbonne Université
Docteur Valérie Gouilleux-Gruart, Université de Tours
Professeur Roberto Mallone, Université de Paris Cité
Docteur Laurent Frenzel, Université de Paris Cité
Docteur Cyril Planchais, Université de Paris Cité
Docteur Sébastien Lacroix-Desmazes, Sorbonne Université
Docteur Srinivas V Kaveri, Sorbonne Université

Président du jury
Rapporteuse
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

RÉSUMÉ

Le transfert transplacentaire d'immunoglobulines G (IgG) maternelles, médié par le récepteur Fc néonatal (FcRn), protège le fœtus/nouveau-né contre les infections durant la maturation de son système immunitaire. Cette interface privilégiée entre la mère et l'enfant a été exploitée pour différentes intentions thérapeutiques comme par exemple dans le cadre de la vaccination ; ou au sein de modèles pré-cliniques, lors du remplacement *in utero* d'enzymes essentielles absentes, ou encore pour modeler les répertoires immunitaires adaptatifs du fœtus, favorisant ainsi le développement d'une tolérance aux protéines du soi.

Le but de mon projet de thèse était de déterminer si l'établissement d'une tolérance spécifique pour une protéine du soi, non exprimée par la descendance, pouvait être induite pendant la vie fœtale. C'est par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques administrés lors de la grossesse, que cette protéine serait transférée au fœtus, et permettrait d'induire une tolérance immunitaire spécifique et de prévenir l'apparition d'une réponse immunitaire adaptative plus tard dans la vie.

L'hémophilie A a été choisie comme modèle clinique pour tester cette hypothèse. Cette maladie hémorragique rare liée au chromosome X est causée par un déficit en facteur VIII (FVIII) pro-coagulant. Les patients hémophiles A développent, selon la gravité de leur pathologie, des saignements spontanés ou provoqués dans les organes internes et les articulations. Afin de prévenir ou de traiter les saignements, des molécules de FVIII substitutives sont fréquemment administrées aux patients. Néanmoins, le problème majeur de ces traitements est le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII, se traduisant par l'apparition d'IgGs inhibitrices de l'activité pro-coagulante du FVIII ; ces IgGs rendent les traitements substitutifs inefficaces. Le développement de la réponse immunitaire anti-FVIII repose en partie sur une absence d'établissement de tolérance centrale et/ou périphérique au FVIII chez les patients.

En exploitant la capacité du FcRn à transférer les IgGs maternelles vers le sang fœtal, nous aspirions à favoriser le transfert de FVIII maternel vers la circulation fœtale et ainsi induire une tolérance envers le FVIII thérapeutique. Au cours de mon travail, j'ai généré des anticorps monovalents humains (FabFc) capables de fixer le FVIII humain et de le transférer au sein d'une descendance hémophile A, de manière dépendante au FcRn. Après avoir validé le transfert transplacentaire de molécules thérapeutiques, j'ai étudié si l'exposition aux antigènes du FVIII lors de l'ontogénie des lymphocytes T, favorisait le développement d'une tolérance immunitaire spécifique. Mes résultats ont identifié les paramètres influant le

RÉSUMÉ

transfert transplacentaire de molécules thérapeutiques ainsi que ceux pouvant impacter l'induction de tolérance immunitaire pendant le stade fœtal. Ce projet de recherche apporte ainsi une preuve de concept sur le transfert efficace d'antigènes via des FabFcs de la circulation maternelle vers la circulation fœtale.

ABSTRACT

The neonatal Fc receptor (FcRn) mediates transplacental delivery of maternal immunoglobulins G (IgG) and provides humoral protection during the maturation of the newborn immune system. This mother-fetus privileged interface has been exploited for therapeutic use with, for example, maternal vaccination; and in pre-clinical models, for *in-utero* replacement of essential lacking enzymes, and the shaping of the fetus' adaptive immune system to promote self-tolerance.

In this context, we investigated whether we could favor the establishment of immune tolerance to self-proteins which are missing in the progeny. I hypothesized that engineered antigen-specific antibodies, administrated during the pregnancy, should transfer their target protein to the fetal circulation, thus favoring specific immune tolerance induction and preventing the development of an adaptive immune response later in life.

Hemophilia A, a rare X-linked hemorrhagic disease caused by insufficient levels of pro-coagulant factor VIII (FVIII) was chosen as clinical model to test this hypothesis. Hemophilia A patients develop spontaneous or injury-caused bleeding in organs and joints, depending on the severity of their pathology. To treat or prevent bleeding, hemophilia A patients are frequently infused with exogenous therapeutic FVIII. The major drawback of FVIII replacement therapy is the development of an anti-FVIII immune response, characterized by the emergence of IgGs that inhibit FVIII pro-coagulant activity, making FVIII infusion inefficient. Anti-FVIII immune response is partially caused by the lack of FVIII-specific central and peripheral tolerance.

By hijacking the FcRn capacity to transfer maternal IgGs to the fetal blood, we aspired to favor the transplacental transfer of maternal FVIII to induce specific tolerance to FVIII in the offspring. In this study, I engineered human monovalent antibodies (FabFc), able to bind and transfer human FVIII to a hemophilic progeny in an FcRn-dependent manner. Following the validation of exogenous and endogenous FVIII maternal transfer, I studied whether the exposition of the progeny with FVIII antigens during the T-cell ontogeny allows the development of a specific immune tolerance. I identified the parameters influencing the transplacental transfer of therapeutic molecules and impacting the establishment of a specific immune tolerance. Thus, this research project provides a proof of concept in the transplacental delivery of antigens through the FabFc.

TABLES DES MATIÈRES

I - HEMOPHILIE A	15
I-1 - DECOUVERTE DE L'HEMOPHILIE	15
I-2 - SIGNES CLINIQUES DE L'HEMOPHILIE A	16
II - LE FACTEUR VIII.....	18
II-1 - DESCRIPTION PROTEIQUE DU FVIII	18
II-2 - GENE ET MUTATIONS GENETIQUES INDUISANT L'HEMOPHILIE.....	19
II-3 - CELLULES SECRETRICES DE FVIII	20
II-4 - CYCLE DE VIE DU FVIII	22
II-5 - ROLE DU FVIII DANS L'HEMOSTASE	24
II-5.A - Hémostase primaire	24
II-5.A1 - Hémostase primaire : vasoconstriction.....	24
II-5.A2 - Hémostase primaire : plaquettes et VWF	24
II-5.B - Hémostase secondaire ou coagulation.....	25
II-5.B1 - Initiation	26
II-5.B2 - Amplification	26
II-5.B3 - Propagation.....	26
II-5.B4 - Stabilisation.....	27
III - TRAITEMENT DES SAIGNEMENTS CHEZ LES PATIENTS HEMOPHILES A	28
III-1 - THERAPIES DE SUBSTITUTION.....	28
III-1.A - FVIII dérivé de plasma humain	28
III-1.B - FVIII recombinant	29
III-1.C - FVIII recombinant à demi-vie prolongée.....	29
III-1.C1 - FVIII-Fc.....	30
III-1.C2 - FVIII-PEG	30
III-1.C3 - BIVV001	31
III-2 - TRAITEMENTS N'IMPLIQUANT PAS LE FVIII.....	32
III-2.A - Agents contournant l'activité du FVIII (« Bypass agents »).....	32
III-2.A1 - Concentré de facteurs du complexe pro-thrombotique activés	33
III-2.A2 - FVII recombinant activé (rFVIIa).....	33
III-2.A3 - Anticorps bispécifique anti FIXa et FX	34
III-2.B - Inhibition des inhibiteurs de la coagulation.....	35
III-2.B1 - Anti-TFPI	35
III-2.B2 - ARN interférant (siRNA) anti-antithrombine.....	36
III-3 - THERAPIE CELLULAIRE	36
III-4 - THERAPIE GENIQUE	37
III-4.A - Vecteurs AAV.....	37
III-4.B - Vecteurs lentiviraux.....	38
III-4.C - Plaquettes transfectées	39
IV - MODELES EXPERIMENTAUX DE L'HEMOPHILIE A.....	40
IV-1 - MODELES D'HEMOPHILIE A SPONTANEE	40
IV-1.A - Chiens.....	40
IV-1.B - Moutons	41
IV-1.C - Rats	41
IV-2 - MODELES D'HEMOPHILIE A GENETIQUEMENT INDUITE	41
IV-2.A - Cochons.....	41
IV-2.B - Rats	42
IV-2.C - Souris.....	43
V - COMPLICATION DES TRAITEMENTS SUBSTITUTIFS	45
V-1 - REPONSE ALLO-IMMUNE DIRIGEE CONTRE LE FVIII	45
V-1.A - Endocytose du FVIII	46
V-1.B - Présentation antigénique	48
V-1.C - Réponse T	49
V-1.D - Réponse B.....	51

TABLES DES MATIÈRES

V-2 - ABSENCE DE TOLERANCE CENTRALE ET PERIPHERIQUE.....	53
V-3 - FACTEURS DE RISQUES FAVORABLES AU DEVELOPPEMENT D'INHIBITEURS	55
V-3.A - Facteurs liés au patient	55
V-3.A1 - Facteurs génétiques liés au FVIII.....	55
V-3.A2 - Facteurs génétiques non liés au gène F8.....	56
V-3.A3 - Voies d'oxydation	58
V-3.A4 - Système du complément	58
V-3.A5 - Voies métaboliques.....	59
V-3.A6 - Cytokines et leurs récepteurs	59
V-3.A7 - Présence d'anticorps non-neutralisants	60
V-3.A8 - Ethnicité	61
V-3.B - Facteurs environnementaux.....	61
V-3.B1 - Sources de FVIII.....	61
V-3.B2 - Dosage du traitement	63
V-3.B3 - Âge du premier traitement	64
VI - INDUCTION DE TOLERANCE IMMUNITAIRE ENVERS LE FVIII THERAPEUTIQUE	65
VI-1 - SURPRESSION IMMUNITAIRE	65
VI-2 - INDUCTION DE TOLERANCE IMMUNITAIRE (ITI)	65
VI-3 - TOLERANCE ORALE.....	67
VI-4 - THERAPIE GENIQUE	67
VI-5 - THERAPIE CELLULAIRE T	68
VI-6 - FVIII-Fc.....	69
VI-7 - PASSAGE TRANSPLACENTAIRE.....	70
VII - TRANSFERT MATERNO-FŒTAL D'IMMUNITÉ.....	72
VII-1 - FORMATION DU PLACENTA	72
VII-1.A - Formation du placenta chez l'Homme	72
VII-1.B - Formation du placenta chez la souris.....	73
VII-2 - TRANSFERT TRANSPLACENTAIRE DES IGG MATERNELLES	75
VII-2.A - Transcytose des IgGs maternelles chez l'Homme.....	75
VII-2.B - Transcytose des IgGs maternelles chez les rongeurs.....	76
VII-3 - EXPRESSION DU FcRN	76
VII-4 - STRUCTURE DU FcRN	77
VII-5 - INTERACTION AVEC LE FcRN	78
VII-6 - TRANSCYTOSE ET RECYCLAGE DES IGGs ET DE L'ALBUMINE	79
VII-6.A - Mécanisme de transcytose.....	79
VII-6.B - Mécanisme de recyclage.....	80
VII-6.C - Facteurs modulant le transfert transplacentaire et le recyclage.....	81
VII-7 - IMPLICATION DU FcRN DANS LA CAPTURE ET LA PRESENTATION D'ANTIGENES.....	82
VII-8 - EFFETS BENEFIQUES DU TRANSFERT TRANSPLACENTAIRE D'IGGs MATERNELLES	83
VII-9 - EFFETS DELETERES DU TRANSFERT TRANSPLACENTAIRE D'IGGs MATERNELLES	84
VII-10 - DETOURNEMENT DES VOIES DE RECYCLAGE ET TRANSCYTOSE A VISEE THERAPEUTIQUE	86
VII-10.A - Molécules thérapeutiques à demi-vie prolongée	86
VII-10.B - Saturation de la voie de recyclage des IgGs	87
VII-10.C - Élimination spécifique d'antigènes ciblés.....	88
VII-10.D - Modelage du système immunitaire fœtale	88
OBJECTIFS	93
RESULTATS	96
I - TRANSFERT MATERNO-FŒTAL DE PROTEINES THERAPEUTIQUES PAR DES IGGs MODIFIEES	96
II - INDUCTION DE TOLERANCE ENVERS LE FVIII THERAPEUTIQUE	141
II - 1- INTRODUCTION.....	141
II - 2 - METHODES	143
II - 3 - RESULTATS.....	145
II - 3.A - Induction de tolérance pour le FVIII thérapeutique chez la souris FVIII-KO	145

TABLES DES MATIÈRES

<i>II -3.B - Induction de tolérance pour le FVIII thérapeutique dans le modèle de FVIII-KO exprimant le FVIII humain transgénique</i>	145
<i>II - 3.C - Étude de l'impact des FabFcs sur la présentation du FVIII aux cellules T</i>	146
DISCUSSION	150
I - IMPACT DES PROPRIETES INTRINSEQUES AUX FABFCS ET AU FVIII SUR LE TRANSFERT TRANSPLENTAIRE	151
<i>I - 1 - Génération d'anticorps monovalents humains anti-FVIII (FabFc)</i>	151
<i>I - 2 - Génération d'un anticorps non-inhibiteur</i>	152
<i>I - 3 - Transfert transplacentaire des FabFcs et du FVIII humain</i>	153
<i>I - 4 - Impact du VWF</i>	153
<i>I - 5 - Impact des phospholipides</i>	153
<i>I - 6 - Impact des récepteurs cataboliques du FVIII</i>	155
<i>I - 7 - Impact de la taille des complexes sur le transfert transplacentaire</i>	157
<i>I - 8 - Impact de la partie Fc sur le transfert transplacentaire</i>	158
<i>I - 9 - Impact de la quantité de FVIII et de FabFc sur le transfert transplacentaire</i>	159
II - ABSENCE D'INDUCTION DE TOLERANCE	160
III - LIMITES DU MODELE MURIN POUR LE PASSAGE TRANSPLENTAIRE ET L'INDUCTION DE TOLERANCE	162
IV - PERSPECTIVES	163
BIBLIOGRAPHIE	166

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

- **AAV** Virus Adéno associé
- **ADCC** Antibody-dependant cellular cytotoxicity
- **ADP** Adénosine di-phosphate
- **Arg** Arginine
- **ASGPR** Asialoglycoprotein receptor
- **Asn** Asparagine

B

- **BAR** Récepteur B à anticorps
- **BCC** Bloc cardiaque congénital
- **BCR** Récepteur B
- **BDD** Délété du domaine B
- **BHK** Fibroblastes de rein de bébé hamster
- **BU** Unité Bethesda
- **β 2m** Bêta-2-microglobuline

C

- **CAR** Récepteur antigénique chimérique
- **CD40L** CD40 ligand
- **CDR** Régions déterminant la complémentarité
- **CHO** Cellules d'ovaires de hamster de Chine
- **CMH** Complexe majeur d'histocompatibilité
- **ConA** Concanavaline A
- **CPA** Cellule présentatrice d'antigène

D

- **DT1** Diabète de type 1

F

- **Fab** Fragment fixant les antigènes
- **Fc** Fragment cristallisable
- **Fc ϵ R** Récepteur Fc epsilon
- **Fc γ R** Récepteur Fc gamma
- **FcRn** Récepteur Fc néonatal

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- **FIIa** Facteur II activé (thrombine)
 - **FIXa** Facteur IX activé
 - **FVIIa** Facteur VII activé
 - **FVIII** Facteur VIII
 - **FVIII :C** Facteur VIII pro-coagulant
- G**
- **GP** Glycoprotéine
 - **GUS** Enzyme B-glucuronidase
- H**
- **HEK** Cellules de rein embryonnaire humain
 - **His** Histidine
 - **HO-1** Hème oxygénase 1
- I**
- **IDO** Indoleamine 2,3 dioxygénase 1
 - **Ig** Immunoglobuline
 - **ITI** Induction de tolérance immunitaire
- K**
- **kb** Kilobases
 - **kDa** Kilo Daltons
- L**
- **LB** Lymphocyte B
 - **LRP1** Lipoprotein receptor-related protein 1
 - **LSEC** Cellule endothéliale sinusoidale du foie
 - **LT** Lymphocyte T
- M**
- **MPS** Mucopolysaccharidoses
- N**
- **NP** Nanoparticules
- O**
- **OVA** Ovalbumine

LISTE DES ABRÉVIATIONS

P

- **pdFVIII** FVIII dérivé de plasma
- **PL** Phospholipides
- **PEG** Polyéthylène glycol

R

- **RE** Réticulum endoplasmique
- **rFVIII** FVIII recombinant
- **Rh** Rhésus
- **ROS** Espèces réactives à l'oxygène

S

- **scFv** Single chain variable fragment
- **siRNA** ARN interférant
- **SNP** Polymorphismes d'un nucléotide

T

- **TCR** Récepteur T
- **TF** Facteur tissulaire
- **TFPI** Inhibiteur du facteur tissulaire
- **Th** Lymphocyte auxiliaire
- **TLR** Récepteur Toll like
- **Treg** Cellule T régulatrice
- **Tyr** Tyrosine

V

- **VWF** Facteur de von Willebrand

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 ACTIVATION DU FVIII ET ROLE DE SES DIFFERENTS DOMAINES.....	19
FIGURE 2 CYCLE DE VIE DU FVIII	23
FIGURE 3 HEMOSTASE PRIMAIRE.....	25
FIGURE 4 COAGULATION.....	27
FIGURE 5 BIVV001	32
FIGURE 6 REPOSE IMMUNITAIRE ANTI-FVIII.....	53
FIGURE 7 ANATOMIES DES PLACENTAS HUMAINS ET MURINS	75
FIGURE 8 TRANSFERT TRANSPLACENTAIRE D'IgGs MATERNELLES ET DE MOLECULES THERAPEUTIQUES	80
FIGURE 9 INDUCTION DE TOLERANCE IMMUNITAIRE ENVERS LE FVIII THERAPEUTIQUE	148
FIGURE 10 STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DU FVIII CHIMERIQUE HUMAIN/PORCIN ET3I ET DU FAB DE SOURIS A9E	152
FIGURE 11 CARACTERISATION ET PASSAGE TRANSPLACENTAIRE DE EL14 FABFc	154
FIGURE 12 ORGANISATION DES PLACENTAS HUMAINS HEMO-MONOCHORIAL ET MURINS HEMO-TRICHORIAL	163

LISTE DES PUBLICATIONS

Ce travail de thèse repose sur les publications suivantes :

Article 1 : **Angelina Mimoun**, Melissa Bou Jaoudeh, Sandrine Delignat, Victoria Daventure, Alejandra Reyes Ruiz, Maxime Lecerf, Aurélien Azam, Remi Noe, Ivan Peyron, Olivier D Christophe, Peter J Lenting, Valérie Proulle, Jenny McIntosh, Amit C Nathwani, Jordan D Dimitrov, Cécile V Denis, Sébastien Lacroix-Desmazes

Transplacental delivery of therapeutic proteins mediated by engineered IgG (Soumis le 7 novembre 2022, Molecular therapy, en attente d'acceptation)

Article 2 : Rohini Sekar, **Angelina Mimoun**, Melissa Bou Jaoudeh, Stéphane Loyau, Sandrine Delignat, Victoria Daventure, Julie Rayes, Yacine Boulaftali, Martine Jandrot-Perrus, Valérie Proulle, Sébastien Lacroix-Desmazes

GPVI is a binding site for factor VIII at the platelet surface (soumis à Haematologica, en revision)

INTRODUCTION

I - Hémophilie A

I-1 - Découverte de l'hémophilie

Les premières traces historiques évoquant une maladie hémorragique héréditaire remontent au II^{ème} siècle après JC. Le Talmud de Babylone, un texte religieux, indique que si deux garçons d'une même famille succombent à une hémorragie lors de la circoncision, qui se déroule huit jours après la naissance, les prochains nés en sont exemptés (Rosner 1969). Le rabbin Simon ben Gamaliel a, quant à lui, interdit la circoncision à un garçon car l'ensemble de ses cousins étaient mort d'hémorragie lors de l'acte rituel. Plus tard, au X^{ème} siècle, Aboulcassis, un des pères de la chirurgie moderne, décrit un cas de maladie sanguine où des garçons d'une même famille étaient décédés à la suite de blessures sans gravité. Tout au long de l'histoire, nous pouvons retrouver des références religieuses à des saignements mortels lors d'actes de chirurgie ou de blessures mineures chez des frères ou des cousins évoquant ce que nous appelons maintenant l'hémophilie (Seligsohn 1973).

La première description moderne d'une maladie hémorragique héréditaire fut publiée dans la Gazette de Salem en 1791 par un journaliste anonyme. Il y décrivait le cas de la famille Zoll où les six garçons étaient décédés après des blessures mineures tandis que leurs demi-frères, nés d'une mère différente, n'étaient pas affectés (Ingram 1976). Les premières descriptions médicales de l'hémophilie suggérant une transmission de la maladie liée au sexe du patient datent de la fin du XVIII^{ème} début du XIX^{ème} siècle. John Conrad Otto, un médecin américain, décrit un trouble hémorragique dont les signes cliniques n'étaient observés que chez les hommes tandis que les femmes étaient conductrices de la maladie (Otto 1996). En 1820, les premières études génétiques des cas d'hémophilie sont publiées (*Encyclographie des sciences médicales. Répertoire général de ces sciences, au XIXe siècle* 1835). C'est d'ailleurs en 1829 que le terme « hémophilie » apparaît pour la première fois (Hopff 1828). L'inclusion des symptômes articulaires comme signes évocateurs d'hémophilie a été évoquée par König à la fin du XVIII^{ème} siècle ; elles étaient auparavant considérées comme des arthrites. Les rares cas de femmes présentant les symptômes de l'hémophilie ont été décrits en 1886. Ces femmes étaient nées d'un mariage entre cousins (Ingram 1976).

Les membres de familles royales, souvent consanguins, étaient particulièrement touchés par les troubles de la coagulation, conférant le surnom de « maladie royale » à cette pathologie. En effet, la reine Victoria était conductrice d'hémophilie B, qu'elle a transmise à

son 8^{ème} enfant le prince Léopold, mort d'une hémorragie cérébrale. Deux de ses filles étaient également conductrices et ainsi l'hémophilie B fut transmise peu à peu aux familles royales d'Espagne, de Russie, et d'Allemagne. Ainsi, les fils des dirigeants de l'Espagne et de la Russie furent atteints par la maladie (Mckusick 1965).

Initialement, il était pensé que les saignements étaient issus d'une fragilité des vaisseaux sanguins, d'un défaut plaquettaire, ou d'un défaut de prothrombine (Addis 1911, p. 19). Ce n'est qu'en 1936, que deux médecins américains ont identifié une molécule extraite du plasma capable de corriger les saignements, appelée « globuline anti-hémophilique » (Patek & Taylor 1936). Des expériences de transfusions sanguines entre individus hémophiles, qui rétablissait complètement mais temporairement la coagulation, ont permis d'identifier deux types d'hémophilie : l'hémophilie A pour la plus commune, associée à un déficit en FVIII, et l'hémophilie B pour le déficit en FIX (Biggs et al. 1952; Hynes et al. 1969; Pavlovsky 1947).

I-2 - Signes cliniques de l'hémophilie A

L'hémophilie A est une maladie hémorragique rare, liée au chromosome X, touchant 1 homme pour 5000 naissances. Ces individus sont porteurs de mutations altérant l'intégrité ou la fonction du facteur VIII (FVIII) pro-coagulant (FVIII :C). Les femmes sont généralement conductrices, bien qu'elles puissent présenter des niveaux réduits de FVIII et des symptômes mineurs. Cette maladie touche l'ensemble des groupes ethniques sans distinctions géographiques.

Les individus sains ont un taux de FVIII fonctionnel qui varie entre 50 et 150%. À l'inverse, un individu est considéré hémophile A lorsqu'il présente moins de 40% de FVIII fonctionnel. L'hémophilie A est classée en trois degrés de sévérité selon la concentration de FVIII :C retrouvée dans le plasma des patients, standardisé par rapport au plasma d'individus sains. Elle est dite sévère si le patient présente moins de 1% de FVIII fonctionnel (ou < 1 UI de FVIII/dL de plasma), modérée entre 1 et 5 % et mineure entre 6 et 40% (Blanchette et al. 2014; Mannucci & Tuddenham 2001).

Dans la majorité des cas, l'hémophilie A est une maladie connue dans la famille et le dépistage néonatal est possible lorsque la mutation est connue (Saxena & Ranjan 2014). Néanmoins dans 30% des cas, l'anomalie génétique apparaît *de novo* et le diagnostic ne se fait qu'après l'apparition de signes cliniques, souvent dès l'âge de la marche chez les hémophiles A sévères (Mancuso et al. 2021; Pollmann et al. 1999; Srivastava et al. 2013). Le diagnostic est

fait d'autant plus tard lorsque les patients sont affectés par une hémophilie A mineure ou modérée.

Tandis que les patients hémophiles A sévères développent des saignements spontanés dans les tissus mous et des hémarthroses, les patients présentant une hémophilie modérée ou mineure développent des saignements provoqués principalement lors de blessures ou d'acte de chirurgie, compliquant leur diagnostic (Berntorp et al. 2021; Mannucci & Tuddenham 2001; Srivastava et al. 2013). En l'absence de traitement substitutif, les patients hémophiles A sévères peuvent développer plus de 30 épisodes hémorragiques par an. Certains saignements peuvent avoir des conséquences mortelles, comme des hémorragies intracrâniennes, gastrointestinales ou trachéales (Srivastava et al. 2013). Des hémarthroses répétées peuvent déformer les articulations et provoquer des arthropathies chroniques, l'atrophie des muscles et la contracture des tissus mous, le tout résultant en des douleurs aiguës ou chroniques impactant la qualité de vie des patients (Barr et al. 2002; Srivastava et al. 2013). Le FVIII ne traversant pas le placenta, des saignements peuvent survenir *in utero* chez le fœtus, avec le développement d'hémorragies intracrâniennes, bien que ces événements soient rares (Singleton & Keane 2012). L'atteinte physique des patients hémophiles A, les exclue fréquemment des activités scolaires et sociales, ce qui peut également impacter le mental des patients (Buranahirun et al. 2020).

Dans les années 1980, la principale complication des traitements substitutifs, était la contamination des patients par des maladies liées aux produits dérivés du sang. En effet, les concentrés de FVIII utilisés en traitement, étaient obtenus en associant le plasma de plusieurs donneurs qui pouvaient être porteurs de pathologies infectieuses. Les patients hémophiles A ont été exposés aux virus de l'immunodéficience humaine ou des hépatites B et C entraînant une surmortalité inacceptable (Mannucci & Tuddenham 2001).

II - Le Facteur VIII

II-1 - Description protéique du FVIII

Le FVIII mature est une glycoprotéine de 2332 acides aminés et d'un poids moléculaire d'environ 280 kilodaltons (kDa). C'est donc l'une des plus larges protéines parmi les facteurs de coagulation. Il est formé d'une chaîne lourde de 200 kDa et d'une chaîne légère de 80 kDa liées l'une à l'autre de façon covalente. La chaîne lourde est constituée des domaines A1, A2 et B ; et la chaîne légère est constituée des domaines A3, C1 et C2 (figure 1) (Gitschier et al. 1984; Toole et al. 1984; Vehar et al. 1984).

Les domaines A, séparés par des petits espaceurs a1, a2 et a3 , présentent 30% d'homologie entre eux et avec le facteur V (Church et al. 1984). Lors du processus de coagulation, le domaine A1 fixe le FX, et les domaines A2 et A3 fixent le facteur IX activé (FIXa) (Bovenschen et al. 2003; Fay et al. 1994; Lapan & Fay 1997, 1998; Lenting et al. 1996). Les sites d'inactivation du FVIII par la protéine C, une protéase, sont également localisés dans les domaines A1 et A2 (Fay 2004; Nogami et al. 2005).

Le domaine B, qui représente près de 40% de la masse moléculaire du FVIII, dû à un important niveau de glycosylation, présente une fonction qui est encore peu comprise. Nous savons néanmoins que ce domaine n'est pas impliqué dans la coagulation, cette partie étant clivée lors de l'activation du FVIII par la thrombine. De plus, des FVIII recombinants délétés de leurs domaines B ont une activité équivalente, si ce n'est supérieure, à celle du FVIII entier (Berntorp 1997; Lenting et al. 1998; Pittman et al. 1993). Des études de la biosynthèse du FVIII ont également démontré l'importance de ce domaine dans son transport et sa sécrétion (Jun et al. 2020; Pipe 2009).

Tandis que le domaine C2 contient les domaines de fixation de la thrombine, du FXa et de la protéine C, et permet l'ancrage du FVIII aux phospholipides (PL), le domaine C1, est impliqué à la fois dans la fixation du FVIII aux PL, et dans la sécrétion du FVIII du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Lenting et al. 1998; Liu et al. 2016; Lü et al. 2011; Meems et al. 2009; Nogami et al. 1999, 2000, 2002). Ils sont également tous deux impliqués dans la fixation du FVIII à sa protéine chaperonne : le facteur de von Willebrand (VWF)

(Jacquemin et al. 2000a,b; Saenko et al. 1994; Shima et al. 1993). Ainsi, les domaines A et C sont-ils indispensables à la fonction pro-coagulante, et à la stabilité du FVIII.

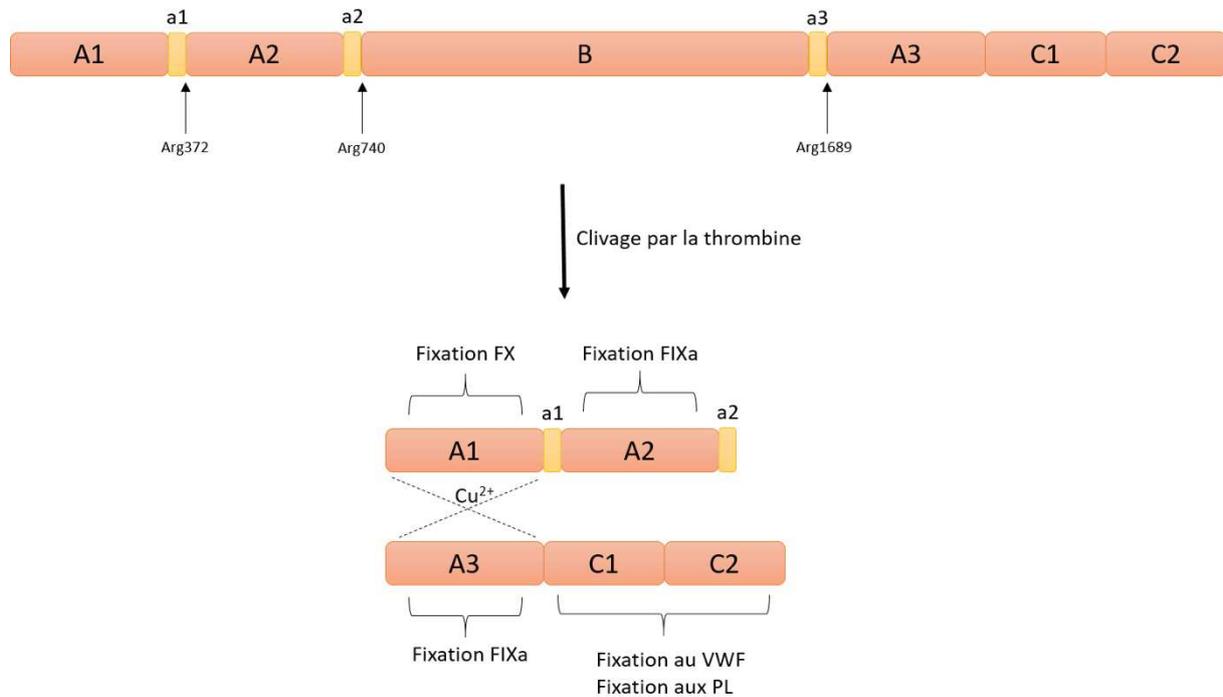


Figure 1 Activation du FVIII et rôle de ses différents domaines. Le FVIII est une glycoprotéine de 2332 acides aminés constituée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, organisées en 6 différents domaines : A1, A2, A3, B, C1 et C2. Son clivage par la thrombine au niveau des Arginines (Arg) 372, 740 et 1689 permet de libérer le domaine B et de former un hétérodimère. Les chaînes légère et lourde restent associées l'une à l'autre via une liaison métallique non-covalente impliquant un ion cuivre entre les domaines A1 et A3. Lors du processus de coagulation, le domaine A1 est impliqué dans la fixation au FX, les domaines A2 et A3 sont impliqués dans la fixation du FIXa et les domaines C1 et C2 sont impliqués dans la fixation aux phospholipides ou au VWF.

II-2 - Gène et mutations génétiques induisant l'hémophilie

Le gène *F8*, codant le FVIII, est situé sur le bras long du chromosome X (Xq28) (Gitschier et al. 1984). Avec une taille de 186 kilobases (kb), le gène *F8*, organisé en 26 exons, fait partie des gènes les plus longs connus à ce jour. La chaîne polypeptidique en résultant est formée de 2351 acides aminés dont 19 forment le peptide signal (Toole et al. 1984; Vehar et al. 1984).

L'hémophilie A est caractérisée par un défaut, voire une absence totale, de sécrétion de FVIII pro-coagulant fonctionnel ou la sécrétion normale d'un facteur incomplètement fonctionnel. Cette aberrante biosynthèse ou sécrétion, résulte de différentes mutations au sein du gène codant le FVIII. Plus de 2300 mutations, des courtes ou larges délétions et insertions, ainsi que des mutations ponctuelles non-sens et faux-sens, ont été identifiées (Johnsen et al. 2017). Au sein du gène *F8*, les introns 1 et 22, particulièrement larges avec une taille supérieure à 14 kb, sont une cible majeure de mutations. Lorsque le patient est hémophile A sévère, donc présente moins de 1% de FVIII :C, les mutations impliquées sont

dans 45% des cas une inversion de l'intron 22 et dans 1,2% des cas l'inversion de l'intron 1 (Johnsen et al. 2017; Naylor et al. 1995). Actuellement, une liste de plus de 120 larges délétions (> 50 paires de bases) ont été associées au développement de l'hémophilie A. Ces larges délétions causent plus de 5% des cas sévères (Graw et al. 2005). Enfin, les mutations ponctuelles non-sens engendrent pour la plupart des cas sévères d'hémophilie A (Castaldo et al. 2007; Johnsen et al. 2017). Lorsque le patient présente une hémophilie A mineure ou modérée, on performe un séquençage de nouvelle génération afin de déterminer l'anomalie génétique dont il est porteur. Les cas d'hémophilie A modérée et mineure sont dans 4% des cas causés par l'inversion de l'intron 22, et dans le reste des cas, liés à des mutations ponctuelles faux-sens ou des petites insertions et délétions.

La moitié des mutations ponctuelles identifiées touchent les trois domaines A du FVIII, altérant son interaction avec ses différents partenaires (Arai et al. 1989; Hakeos et al. 2002; Mumford et al. 2002; Pattinson et al. 1990). Au sein du domaine B, les mutations faux-sens ne sont délétères que lorsqu'elles sont situées au sein des sites de clivage de la thrombine et les mutations non-sens, tronquant le domaine B, affectent l'ensemble du FVIII et provoquent une hémophilie A sévère (Graw et al. 2005; Pahl et al. 2014). Des mutations dans les domaines C1 et le C2, affectent quant à elles la stabilité de la protéine, en altérant la fixation du FVIII au VWF mais également aux phospholipides (Jacquemin et al. 2000b, 2003a; Liu et al. 2000).

Les mutations au sein du gène du FVIII ne sont pas les seules à causer un déficit en FVIII. En effet, des mutations touchant les protéines impliquées dans la translocation du peptide du réticulum endoplasmique vers le Golgi, ont été associées avec un déficit en FVIII (Nichols et al. 1998; Segal et al. 2004).

Enfin, 2% des cas d'hémophilie A ont été décrits en absence de mutations exoniques ou introniques (Klopp et al. 2002). Ces patients présentent des micro-ARN qui ciblent l'ARN transcrit à partir du gène *F8* et réduisent son expression, ce qui se traduit par une diminution des niveaux protéiques de FVIII (Jankowska et al. 2020; Sarachana et al. 2015).

II-3 - Cellules sécrétrices de FVIII

L'identification des cellules impliquées dans la production de FVIII a toujours été sujet à débat. Dès les années 1970, le foie était considéré comme l'unique organe sécréteur de FVIII. En effet, la transplantation de foie sain chez des chiens (Marchioro et al. 1969; Webster et al. 1971) ou chez des patients hémophiles A (Bontempo et al. 1987), restaurait la production de

FVIII et la coagulation. Le foie est en partie constitué de cellules parenchymateuses appelées hépatocytes, et de cellules non-parenchymateuses. Ces cellules non-parenchymateuses, comprennent les cellules endothéliales sinusoidales du foie (LSEC), et des cellules immunitaires, dont des macrophages appelés cellules de Kupffer.

Historiquement, les hépatocytes avaient été identifiés comme producteurs majoritaires de FVIII (Kelly et al. 1984; Wion et al. 1985). Quelques années plus tard, des équipes de recherche ont remis en cause ces résultats en évoquant les LSEC comme productrices de FVIII (Hellman et al. 1989). La transplantation d'autres organes comme les poumons, la rate et les ganglions lymphatiques corrigeait les niveaux de FVIII chez des chiens hémophiles A, suggérant l'implication d'un type cellulaire plus largement distribué dans les organes comme les cellules endothéliales (Groth et al. 1974; Veltkamp et al. 1974). L'implication des LSEC dans la production de FVIII fut par la suite confirmée par de nombreux travaux (Everett et al. 2014; Fahs et al. 2014; Follenzi et al. 2008; Shahani et al. 2014; Zanolini et al. 2015).

Par ailleurs, la question de l'implication de sites extra-hépatiques dans le maintien de la production de FVIII, fût soulevée à la suite de l'observation de niveaux normaux de FVIII chez des patients souffrant de maladies hépatiques chroniques, ou de l'absence de développement d'hémophilie A après la transplantation du foie d'un patient hémophile A à un patient sain (Madeira et al. 2009; Rapaport et al. 1960). À ce jour, les cellules endothéliales du poumons, du cœur, des intestins et du derme ont été impliquées dans la sécrétion de FVIII (Jacquemin et al. 2006; Pan et al. 2016; Shahani et al. 2010) et des analyses transcriptomiques ont démontré la présence d'ARNm du FVIII dans de nombreux autres organes (Merlin et al. 2019).

Enfin, la restauration du phénotype d'une souris hémophile A par la transplantation de moelle osseuse de donneur sain, suggérait l'implication de cellules hématopoïétiques dans la production de FVIII (Follenzi et al. 2012). Des études ont démontré que les monocytes et les macrophages de la moelle osseuse et de la rate humaines, exprimaient le FVIII, et que leur transplantation chez des souris hémophiles A restaurait la synthèse de FVIII et la coagulation (Zanolini et al. 2015). Le foie reste cependant le site majoritaire de production du FVIII.

II-4 - Cycle de vie du FVIII

Les études sur la biosynthèse du FVIII ont démontré que cette protéine est mal sécrétée. En effet, le gène est à la fois peu transcrit et la sécrétion est inefficace (Dorner et al. 1987; Kaufman et al. 1989). Le processus de sécrétion débute par l'injection de la protéine en cours de synthèse à partir de l'ARNm, vers la lumière du réticulum endoplasmique (RE), où les asparagines (Asn) des domaines A1, B, A3, et C1 sont glycosylées (Medzihradzky et al. 1997). Dans le RE, un système de « contrôle-qualité » impliquant des protéines chaperonnes telles que la calréticuline, la calnexine, et BiP, permet d'éliminer les protéines mal repliées avant qu'elles n'atteignent le Golgi (Ellgaard et al. 1999). Une grande partie du FVIII produit étant mal conformée, la molécule interagit via son domaine A1 avec les protéines chaperonnes, et est séquestrée puis dégradée par protéolyse (Dorner et al. 1987, 1989; Marquette et al. 1995; Pipe et al. 1998; Plantier et al. 2005; Swaroop et al. 1997). Le FVIII ayant passé le « contrôle qualité » du RE, lie un complexe de récepteurs cargo formé de LMAN1, une lectine liant les sucres se terminant par des mannoses, et de MCFD2, la protéine 2 de déficit en facteur de coagulation multiple, qui le transportent vers le Golgi (Nichols et al. 1998; Zheng et al. 2009). Nos études ont d'ailleurs suggéré l'importance de l'Asn239 du domaine A1 du FVIII, portant une glycosylation se terminant par un mannose, dans le transport du FVIII vers le Golgi (Delignat et al. 2020). Une fois dans l'appareil de Golgi, le FVIII subit des nouvelles modifications post-traductionnelles avec l'ajout de O-glycosylations, la modification des N-glycans greffés sur les asparagines, et la sulfatation des tyrosines présentes dans les espaceurs $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (Lenting et al. 1998; Michnick et al. 1994). Le domaine B subit enfin une protéolyse afin de rompre la liaison covalente entre le domaine B et l'espaceur $\alpha 3$, et ainsi libérer la chaîne lourde et la chaîne légère formant l'hétérodimère circulant dans le plasma (Lenting et al. 1998). Les chaînes légère et lourde du FVIII restent associées l'une à l'autre par l'intermédiaire d'une liaison métallique non-covalente, impliquant un ion cuivre entre les domaines A1 et A3 (Tagliavacca et al. 1997; Wakabayashi et al. 2001).

Immédiatement après avoir été libéré dans le plasma, le FVIII lie de manière non-covalente sa protéine chaperonne, le VWF, via les domaines C1 et C2 du FVIII et D'D3 du VWF. Particulièrement, les tyrosines sulfatées (Tyr)¹⁶⁶⁴ et Tyr¹⁶⁸⁰ sont indispensables à la fixation du VWF au FVIII (Leyte et al. 1989, 1991; Saenko et al. 1994, 1999; Weiss et al. 1977). Des multimères de VWF fixent une molécule de FVIII avec une affinité de 0,5 nM. En raison de la faible quantité de molécule de FVIII présente en circulation, on considère qu'une molécule de

FVIII est fixée par 50 molécules de VWF (Vlot et al. 1995). 95 à 98% du FVIII plasmatique sont associés au VWF. Le VWF prolonge la demi-vie du FVIII à 12 heures environ, en le protégeant des attaques protéiques de la part de la protéine C et du FXa, et de l'endocytose par des récepteurs de dégradation (Fay et al. 1991a; Lenting et al. 2007; Nogami et al. 2002). La fixation du VWF, préserve également la stabilité de la structure hétérodimérique du FVIII, et permet son transport vers les sites de saignements (Lacroix-Desmazes et al. 2008). Une fois sur le site de saignement, le FVIII est clivé et activé par la thrombine (ou facteur II activé, FIIa), provoquant un changement de conformation qui rompt sa liaison avec le VWF (Eaton et al. 1986).

Après avoir assuré sa fonction, le FVIIIa est désactivé par le clivage des domaines A1 et A2 par la protéine C activée, ou par dissociation spontanée du domaine A2 (Fay et al. 1991b; Lollar et al. 1992; Pipe et al. 1999). Enfin, afin de réguler les niveaux plasmatiques des complexes VWF/FVIII, des récepteurs cataboliques exprimés par des cellules « scavenger », sont impliqués dans leur endocytose et leur dégradation (Bovenschen et al. 2005; Pegon et al. 2012; Rastegarlarlari et al. 2012; Saenko et al. 1999; Swystun et al. 2018, 2019). Le catabolisme des complexes VWF/FVIII à lieu dans le foie et la rate, impliquant principalement les LSEC et les cellules endothéliales (Navarrete et al. 2009; Swystun et al. 2018; van Schooten et al. 2008).

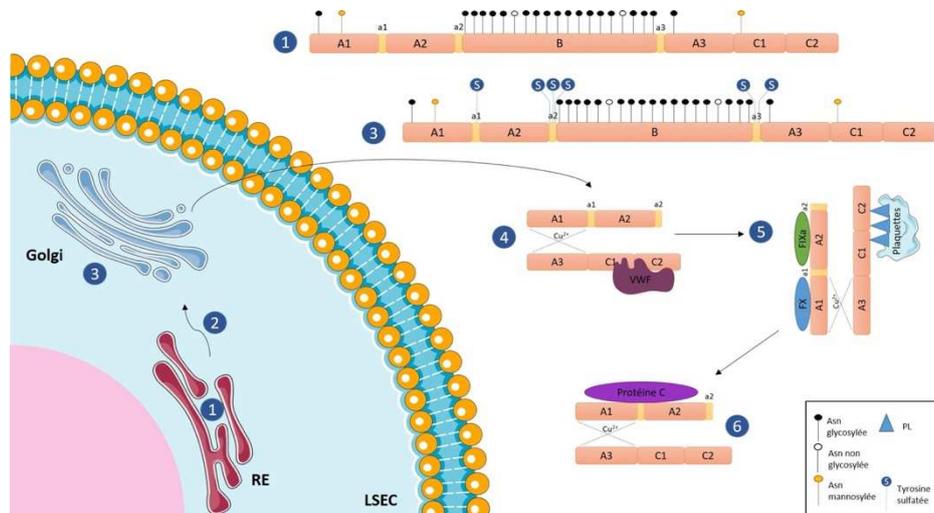


Figure 2 **Cycle de vie du FVIII.** (1) Le FVIII en cours de synthèse migre vers le réticulum endoplasmique où les asparagines des domaines A1, B, A3 et C1 sont glycosylées. (2) Le FVIII est ensuite transloqué par un complexe de récepteurs cargo LMAN1 et MCFD2 vers l'appareil de Golgi. (3) Au sein du Golgi, le FVIII subit de nouvelles modifications post-traductionnelles, avec par exemple, la sulfatation des Tyrosines présentes dans les espaceurs $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. (4) Le FVIII est ensuite libéré dans le plasma, où il lie immédiatement sa protéine chaperonne le VWF. (5) Le VWF transporte le FVIII vers le site de saignement, où ce dernier lie les phospholipides en surface des plaquettes et assure sa fonction dans la coagulation. (6) Une fois son rôle assuré, le FVIII est désactivé par la protéine C activée, par dissociation spontanée ou éliminé de la circulation par des récepteurs cataboliques exprimés en surface des cellules « scavenger ». Une partie de cette figure a été dessinée en utilisant des images provenant de Servier Medical Art.

II-5 - Rôle du FVIII dans l'hémostase

L'hémostase est un système de protection et réparation après une lésion vasculaire. Théoriquement, l'hémostase se déroule en deux parties distinctes, mais ces deux parties se déroulent en réalité simultanément. L'hémostase primaire consiste en la formation d'un clou plaquettaire au site de saignements. L'hémostase secondaire ou coagulation, a pour objectif de former de la fibrine qui consolide ce clou plaquettaire. L'hémostase est suivie de la fibrinolyse, dont le rôle est de dissoudre le thrombus une fois la brèche vasculaire réparée, et permettre la revascularisation du vaisseau.

II-5.A - Hémostase primaire

L'hémostase primaire est la première réponse de l'organisme à une blessure. Son rôle est de stopper immédiatement les saignements (Figure 3).

II-5.A1 - Hémostase primaire : vasoconstriction

À l'état basal, les plaquettes ne sont pas activées, elles n'interagissent pas avec la surface des cellules endothéliales non lésées. Les plaquettes inactivées sont caractérisées par l'expression différentes glycoprotéines (GP), dont le complexe GP Ib-IX-V et l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (ou GPIIb et GPIIIa). Quelques secondes après une lésion, des contractions musculaires se produisent au niveau du site de saignement. Cette vasoconstriction permet de réduire la perte de sang. La vasoconstriction induit également l'apparition de contraintes de cisaillement (shear stress). Ces contraintes de cisaillement vont favoriser la relocalisation des plaquettes vers les parois des vaisseaux, favorisant ainsi leur regroupement au niveau du site de saignement (Roth 1992; Schafer 1997).

II-5.A2 - Hémostase primaire : plaquettes et VWF

Après une blessure, les composants de la matrice sous-endothéliale, et en particulier les molécules d'adhésion comme le collagène, sont exposées à la circulation sanguine. Dans la circulation, le VWF joue le rôle de pont entre les fibres de collagène et les plaquettes conduisant à une adhésion plaquettaire. La fixation des plaquettes au VWF, via GPIb, GPIX et GPV exprimées à leur surface, induit leur activation. Elles changent de conformation et sécrètent de l'adénosine di-phosphate (ADP), qui agit en association avec la thrombine (FIIa) pour activer et recruter des plaquettes supplémentaires au site de lésion. Les plaquettes activées sécrètent également du thromboxane A2, qui provoque leur agrégation. La dernière étape de l'activation plaquettaire est associée à un changement de conformation de

l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, qui agit comme récepteur de haute affinité pour les ligands extracellulaires, dont le fibrinogène. Les plaquettes sont alors liées les unes aux autres grâce au fibrinogène, en un clou plaquettaire qui reste néanmoins instable. (Andrews et al. 1997; Bennett 1990; Heemskerk et al. 2002; Jung & Moroi 2000; Ware & Heistad 1993).

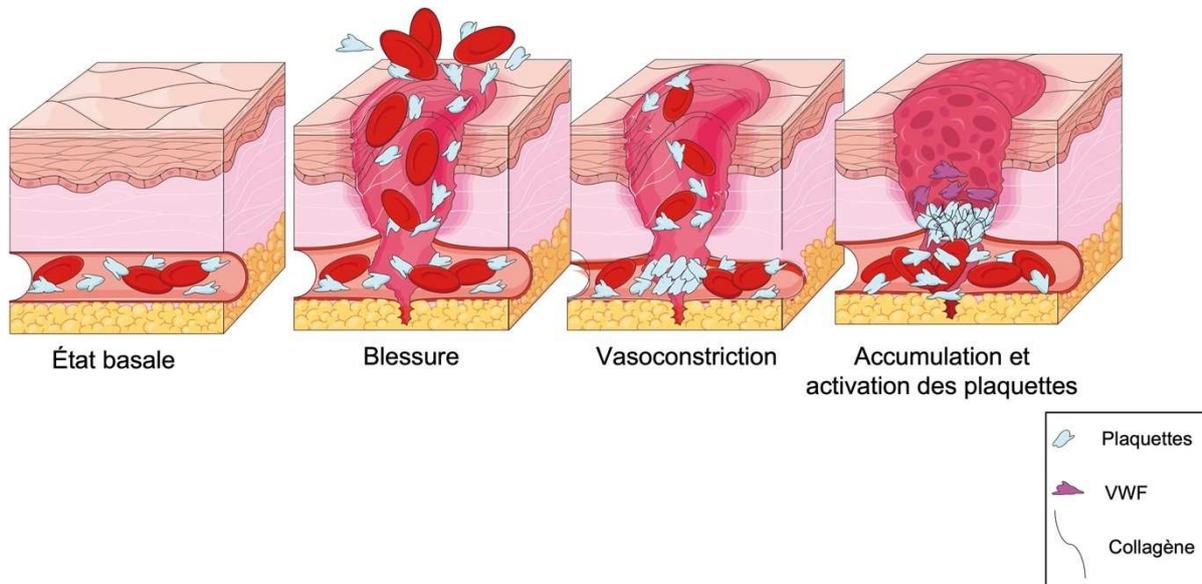


Figure 3 Hémostase primaire À la suite d'une blessure, des contractions musculaires ont lieu au niveau du site de saignement. Ces contractions musculaires permettent à la fois de réduire le volume de sang perdu, et de relocaliser les plaquettes non activées vers le site de saignement. La blessure expose les composés de la matrice sous endothéliale, comme le collagène. C'est via le VWF que les plaquettes peuvent interagir avec le collagène formant ainsi un amas plaquettaire. Les plaquettes sont alors activées par le VWF, ce qui leur permet de lier du fibrinogène qui consolide le clou plaquettaire, qui reste néanmoins instable. Cette figure a été dessinée à partir d'images provenant de Smart Servier Medical Art.

II-5.B - Hémostase secondaire ou coagulation

Bien que leur nom semble définir deux processus distinct, l'hémostase primaire et la coagulation agissent de concert. En effet, tandis que la thrombine, un des acteurs de la coagulation, est impliquée dans l'activation plaquettaire, les plaquettes, elles, forment la surface permettant l'assemblage des complexes enzymatiques de la coagulation. Le clou plaquettaire formé lors de l'hémostase primaire risque de se dissocier s'il n'est pas consolidé. Le rôle de la coagulation est de générer de la fibrine, qui piège les plaquettes les unes avec les autres et ainsi forme un caillot sanguin stable. Initialement, la coagulation était pensée comme deux voies distinctes, extrinsèque et intrinsèque, qui convergeaient en une voie commune résultant en la transformation du fibrinogène en fibrine. Cependant, l'observation d'une coagulation normale en cas de déficit en FXII, mais pas en cas de déficit en FVIII souleva la question de la validité de ce modèle. De plus, la capacité du FVIIa à activer à la fois le FIX et le FX, démontrait que les facteurs de coagulations faisaient tous partis d'un même processus. De ces observations émergeât le modèle de coagulation cellulaire, se déroulant en quatre

étapes : l'initiation, l'amplification, la propagation et la stabilisation (Hoffman & Monroe 2001; Roberts et al. 1998).

II-5.B1 - Initiation

À l'état basal, le facteur tissulaire (TF) est séparé de la circulation sanguine par l'endothélium afin de prévenir l'activation intempestive de la coagulation. À la suite d'une blessure, les cellules endothéliales libèrent du TF qui est exposé à la circulation sanguine. Dans la circulation, le TF fixe le FVII qu'il active. Ensemble ils forment un complexe qui active le FX et à moindre mesure le FIX. Le FXa fixe ensuite la surface des cellules exprimant du TF, et clive la prothrombine en thrombine. À ce stade, la formation de thrombine est faible et la réaction peut être stoppée par l'inhibiteur de TF : le TFPI (Hoffman et al. 1995; Kjalke et al. 1998) (Figure 4).

II-5.B2 - Amplification

La faible proportion de thrombine générée lors de la phase d'initiation, ne suffit pas à la formation de fibrine. Néanmoins, elle est suffisante à l'amplification de la cascade de coagulation. Elle agit à trois niveaux : I) elle active les plaquettes, qui exposent alors des phospholipides anioniques de surface initialement séquestrés à l'intérieur de la surface membranaire (mécanisme « flip-flop »), où se déroule l'intégralité de la cascade de coagulation ; II) en parallèle, le FVIII transporté par le VWF au niveau du site de saignement, est clivé et activé par la thrombine ; III) il en est de même pour le FV et le FXI. Les cofacteurs VIIIa, Va et FXIa s'ancrent alors aux phospholipides en surface des plaquettes activées. Le FIXa, activé lors de la phase d'initiation, fixe ensuite le FVIIIa pour former le complexe tenase et activer le FX. Dans un même temps, le FXIa formé lors du processus d'initiation, active le FIX amplifiant ainsi l'ensemble du système et assurant la génération continue de thrombine. Le FXa, qui après interaction avec son cofacteur FVa, forme le complexe prothrombinase et clive la prothrombine en thrombine (Monroe et al. 1994) (Figure 4).

II-5.B3 - Propagation

L'accumulation des facteurs formant les complexes tenase et prothrombinase au niveau des plaquettes, renforce l'activation des plaquettes, et la génération et l'accumulation de thrombine. L'explosion de thrombine formée à cette étape permet cette fois de cliver le fibrinogène en fibrine, et permet la libération de fibrinopeptides solubles et la multimérisation de la fibrine (Hoffman et al. 1995).

II-5.B4 - Stabilisation

À l'aide du FXIII, une transglutaminase activée par la thrombine, les multimères de fibrine forment finalement un réseau consolidant le clou fibrino-plaquettaire, stoppant ainsi le saignement de manière durable (Board et al. 1993; Hoffman & Monroe 2001). Par ailleurs, la thrombine active également l'inhibiteur de fibrinolyse TAFI, afin de dissoudre le clou fibrino-plaquettaire et re-perméabiliser le vaisseau une fois le dommage réparé (Bombeli & Spahn 2004; Lasne et al. 2006).

L'absence de FVIII dans le cadre de l'hémophilie A ne perturbe pas le déroulement de l'hémostase primaire, le clou plaquettaire est donc bien formé. Cependant, jouant un rôle central dans l'étape d'amplification de la coagulation, son absence réduit drastiquement la formation de thrombine, donc de fibrine, et la consolidation du thrombus plaquettaire stable. Les saignements chez les patients hémophiles A ne sont donc stoppés que temporairement. Une thérapie rétablissant la coagulation de ces patients est donc indispensable.

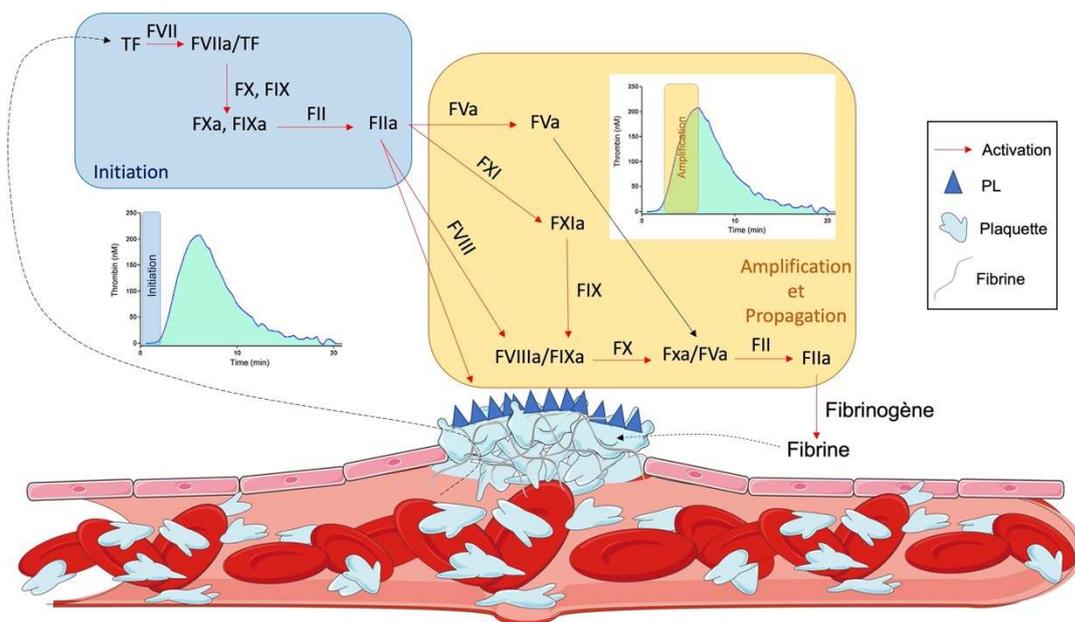


Figure 4 **Coagulation.** La coagulation se déroule en surface des plaquettes activées lors de l'hémostase primaire. Après une blessure, du facteur tissulaire (TF) est relargué en circulation, il fixe alors le FVII et l'active en FVIIa. Ensemble ils forment un complexe et activent le FX et le FIX. Cette première formation de FXa, permet la formation d'un peu de thrombine (FIIa) à partir de prothrombine (FII). La thrombine formée est néanmoins insuffisante pour promouvoir la formation de fibrine. Elle permet uniquement d'activer les plaquettes, le FVIII, le FV et le FIX. Ensemble, le FVIIIa et le FXa forment le complexe tenase et activent le FX. Le FXa et le FVa forment alors le complexes prothrombinase et convertissent la prothrombine en thrombine. Cette boucle de formation de thrombine est amplifiée grâce au FXIa, qui active le FIX ce qui permet une formation continue de thrombine. Cette accumulation de thrombine permet cette fois le clivage du fibrinogène en fibrine. À l'aide du FXIII, la fibrine forme un clou fibrino-plaquettaire stable. Une partie de cette figure a été dessinée en utilisant des images provenant de Servier Medical Art.

III - Traitement des saignements chez les patients hémophiles A

L'hémophilie A est un trouble héréditaire de la coagulation caractérisé par l'absence de FVIII pro-coagulant fonctionnel. Pour traiter ou éviter le développement de saignements spontanés ou provoqués, des molécules rétablissant la coagulation sont injectées aux patients. À ce jour, plusieurs types de traitements des saignements liés à l'hémophilie A sont utilisés : les thérapies substitutives impliquant l'injection de FVIII natif ou modifié, ou de molécules pro-coagulantes contournant l'activité du FVIII, et la thérapie génique.

III-1 - Thérapies de substitution

Le premier succès de traitement de saignements de l'hémophilie A, date de 1840 avec la transfusion du sang de donneurs sains (Lane 1840). Ce traitement était la seule thérapie efficace, jusque dans les années 1950, où la transfusion de plasma fut mise au point. Le contrôle des saignements nécessitait la transfusion de gros volume de plasma, obligeant les patients à être hospitalisés, et les quantités de FVIII présentes ne suffisaient pas à stopper les hémorragies sévères. Depuis les années 1980, les thérapies de substitution du FVIII, reposent sur la purification de FVIII à partir de plasma de donneurs sains ou, grâce au clonage du gène du FVIII, sur la biosynthèse de la protéine recombinante (White et al. 1989). Ces traitements sont administrés à la demande lors d'un épisode de saignement, ou en prophylaxie plusieurs fois par semaine pour prévenir l'apparition des saignements. Outre la lourdeur de l'administration fréquente des traitements par voie intraveineuse, et avec l'élimination du risque du développement d'infections virales après les années 1980, le problème majeur des traitements substitutifs est le développement d'anticorps anti-FVIII inhibiteurs de l'activité pro-coagulante du FVIII, rendant les traitements inefficaces (pour plus de précisions voir la partie V) (Aznar et al. 2012; Berntorp et al. 2003).

III-1.A - FVIII dérivé de plasma humain

La purification du FVIII à partir de pools de plasma humain (pdFVIII) il y a plus de 50 ans, a permis d'améliorer les conditions de vie des patients hémophiles A. Le pdFVIII est obtenu en rassemblant le plasma de milliers de donneurs sains. L'utilisation de pdFVIII a toutefois été réduite pendant un certain temps, à cause des transmissions d'infections via le sang dans les années 1980, notamment le HIV. Cependant depuis ce scandale, les produits plasmatiques subissent une inactivation virale limitant ainsi le risque d'infection.

III-1.B - FVIII recombinant

Une fois le gène du FVIII cloné dans les années 1980, la production de FVIII recombinant (rFVIII) a résolu à la fois la dépendance au plasma humain, mais aussi le problème de transmission de maladies infectieuses (Gitschier et al. 1984; Toole et al. 1984; Wood et al. 1984). Ce rFVIII existe sous deux formats : entier ou sans le domaine B (BDD pour «B domain-deleted»), ce domaine n'étant pas nécessaire à la fonction pro-coagulante du FVIII (Bihoreau et al. 1991; Miao et al. 2004; Pipe 2008; Sandberg et al. 2001). Bien que ce produit soit dit délété de son domaine B, une petite portion persiste afin de faciliter sa sécrétion.

Une alternative à l'utilisation de rFVIII humain est l'utilisation de FVIII BDD porcin recombinant (Obizur) qui, en raison de ses différences dans les domaines A2 et C2 avec le FVIII humain, échappe en général aux inhibiteurs anti-FVIII humains (Healey et al. 1996; Mannucci & Franchini 2017; Türkantoz et al. 2020). Néanmoins cette alternative ne peut être utilisée à répétition, car l'utilisation continue de ce FVIII induit le développement d'inhibiteurs spécifiques du FVIII porcin (Healey et al. 2009).

Ces dernières années, de nouvelles molécules ont émergé, telles que le FVIII recombinant à chaîne polypeptidique unique (Ionoctocog alfa) présentant un domaine B tronqué. Cette molécule est caractérisée par l'absence du site de clivage par la furine entre les chaînes légère et lourde, ce qui permet la sécrétion d'un FVIII monomérique. Ce FVIII « simple chaîne » a une affinité prétendument augmentée pour le VWF, qui prolongerait ainsi sa demi-vie par rapport à un rFVIII classique (S et al. 2015; Zollner et al. 2014).

Malgré tout, la demi-vie de ces molécules reste courte (8-12 heures), obligeant les patients à se traiter plusieurs fois par semaine pour maintenir des taux de FVIII :C homéostatiques, et ainsi prévenir l'apparition de saignements (Björkman et al. 2009). De plus, l'ensemble de ces traitements induisent le risque de développement d'inhibiteurs rendant le traitement inefficace.

III-1.C - FVIII recombinant à demi-vie prolongée

Le développement de FVIII recombinant à demi-vie prolongée, a pour objectif d'améliorer les conditions de traitements des patients hémophiles A en espaçant les injections de protéines thérapeutiques. Ces nouvelles molécules, ont été pensées pour soulager les conditions de traitements qui sont très lourdes, à la fois lors de traitement de saignements aigus ou en traitement prophylactique (Jiménez-Yuste et al. 2014; Mancuso & Santagostino

2017). Afin de prolonger la demi-vie du FVIII recombinant, de nombreuses approches ont été imaginées.

III-1.C1 - FVIII-Fc

La technologie d'extension de demi-vie par la fusion d'un Fc, repose sur le mécanisme de recyclage impliquant le FcRn (pour plus de précisions voir la partie consacrée au « Transfert materno-fœtale »). La fusion d'un Fc au FVIII ne permet l'allongement de la demi-vie du FVIII que de 1,5 fois soit 19 heures (Mahlangu et al. 2014). Une molécule de rFVIII BDD, est liée de façon covalente au fragment Fc d'une IgG1 humaine en une chaîne protéique unique (Leksa et al. 2017; Powell et al. 2012). La partie FVIII du rFVIII-Fc est structurellement et fonctionnellement identique à un rFVIII, permettant ainsi sa fixation au VWF et aux phospholipides (Leksa et al. 2017; Peters et al. 2013). L'efmoroctogog alfa (Elocta® et Eloctate®), a été approuvé par les agences du médicament pour le traitement prophylactique chez des patients déjà traité avec du FVIII; et un essai clinique de phase III a été mené chez des patients naïfs n'ayant jamais reçu de FVIII (NCT02234323) (Königs et al. 2022). Il ne convient cependant pas aux patients ayant développé des inhibiteurs.

III-1.C2 - FVIII-PEG

La seconde approche visant à prolonger la demi-vie du FVIII, repose sur sa conjugaison aléatoire ou site-spécifique à des polymères hydrophiles de polyéthylène glycol (PEG) (Caliceti & Veronese 2003). Cette modification permet également d'étendre la demi-vie du FVIII à 19 heures (Coyle et al. 2014; Tiede et al. 2013). Les PEG augmentent le poids moléculaire des protéines en formant un nuage hydrophile autour de ces dernières, les protégeant ainsi de la protéolyse. De plus, la présence de PEG augmente la demi-vie de molécules en réduisant leur élimination par des récepteurs de clairance : d'une part par encombrement stérique et d'autre part en modifiant les charges en surface des protéines (Harris et al. 2001; Veronese & Pasut 2005). Tout comme pour le rFVIII ces produits existent sous forme de FVIII entier, BDD ou encore sous forme de chaîne polypeptidique unique (Coyle et al. 2014; Tiede et al. 2013). De nombreux FVIII-PEG ont été approuvés par les agences du médicament ou sont en cours d'essais cliniques comme l'Adynovate® (Rurioctocog alfa pegol), Jivi® (Damoctocog alfa pegol) ou Esperoct® (Turoctocog alfa pegol). Néanmoins, l'utilisation intensive des PEG dans l'alimentation, les cosmétiques et d'autres produits pharmaceutiques provoque le développement d'allergies ou hypersensibilités sévères (Wenande & Garvey 2016). Les PEG interagissent avec le système immunitaire induisant à la fois une réponse innée et adaptative.

En effet des lymphocytes T, des IgMs (principalement) et IgGs spécifiques des PEG, ont été retrouvés à la fois chez des patients traités avec des thérapies conjuguées au PEG et chez des individus sains (Fang et al. 2022; Meller et al. 2015; Richter & Akerblom 1984; Shiraishi & Yokoyama 2019). De plus, la réponse anti-PEG réagit à l'ensemble des polymères ayant une structure semblable au PEG. Enfin chez la souris, les PEG ont tendance à s'accumuler dans les os, les muscles, la peau et le foie, le temps d'accumulation dépendant de la perméabilité du tissu (Yamaoka et al. 1994). La vacuolisation des poumons, de la rate, et des ganglions lymphatiques suite à l'injection des PEG a été décrite chez des rats, toutefois en absence d'inflammation (Fang et al. 2022).

Malgré l'addition de molécules destinées à moduler la demi-vie du FVIII, de fortes variations inter-individuelles de la clairance du FVIII ont été remarquées. En effet, les niveaux de VWF, le groupe sanguin et même l'âge jouent un rôle dans la régulation de la demi-vie du FVIII (Björkman et al. 2012; Fijnvandraat et al. 1995; Vlot et al. 2000).

III-1.C3 - BIVV001

Comme dit précédemment, la fixation du VWF au FVIII permet de protéger ce dernier des dégradations protéiques et d'inhiber sa fixation aux récepteurs d'élimination, prolongeant ainsi sa demi-vie. Bien que l'ajout d'un Fc ou de PEG prolonge la demi-vie du FVIII de 1,5 à 2 fois, le facteur limitant de l'extension de la demi-vie du FVIII est la demi-vie du VWF (15 heures environ), auquel le FVIII est associé (Pipe et al. 2016). En effet l'élimination du FVIII-Fc chez les patients dépend directement des niveaux de VWF retrouvés chez ces derniers (Powell et al. 2012).

C'est en tenant compte de cette limitation, qu'une nouvelle molécule a été générée récemment. BIVV001 est un rFVIII-Fc associé de façon covalente aux domaines D'D3 du VWF prévenant ainsi la fixation du rFVIII-Fc au VWF endogène (Figure 5). Un polypeptide XTEN de 188 acides aminés est inséré à la place du domaine B du FVIII, et un second polypeptide XTEN de 144 acides aminés se trouve entre les domaines D'D3 du VWF et le Fc (Seth Chhabra et al. 2020). Ces polypeptides agissent comme les PEG, ils prolongent donc la demi-vie de molécules en augmentant le volume hydrodynamique des molécules, limitant ainsi leur clairance par les reins (Haeckel et al. 2016). Les XTEN sont constitués d'acides aminés qui ne s'ancrent ni aux CMH I ni au CMH II, évitant la formation de néo-épitopes T. Les acides aminés hydrophobes ont ainsi été exclus de ces structures (Schellenberger et al. 2009). L'introduction d'un site de clivage entre le Fc et le XTEN-D'D3, permet la libération du FVIII-Fc après clivage par la

thrombine (Seth Chhabra et al. 2020). Cette construction finale présente une demi-vie deux fois plus longue que celle du VWF endogène, avec une demi-vie de l'ordre de 30 à 40 heures (Konkle et al. 2020; Seth Chhabra et al. 2020).

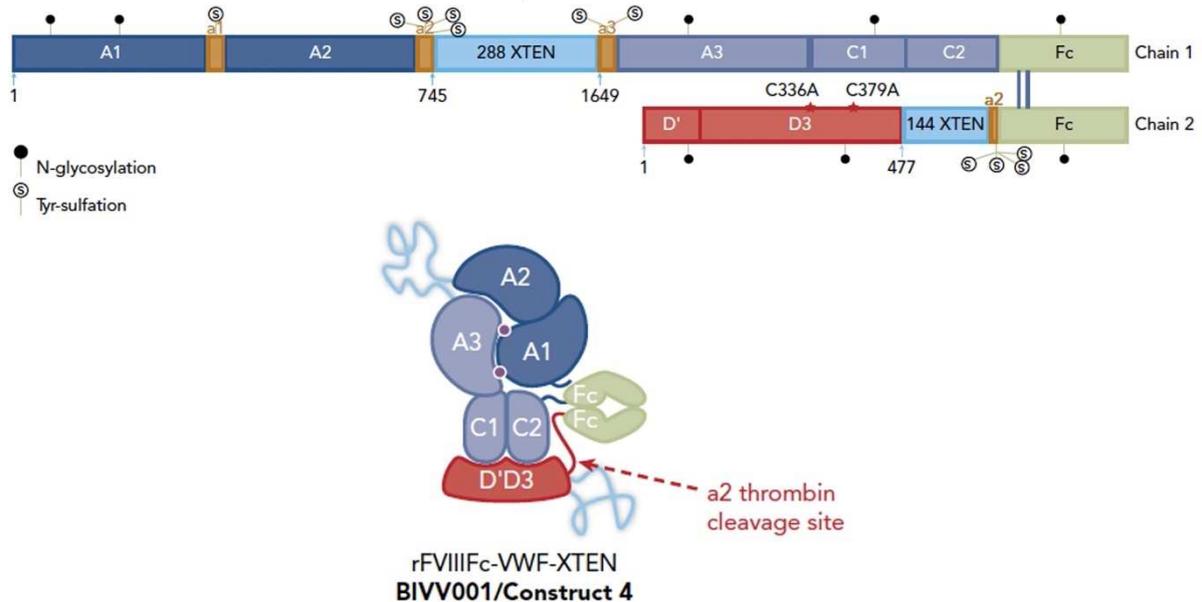


Figure 5 **BIVV001**. BIVV001 est constitué d'un rFVIII-Fc, associé de façon covalente aux domaines D'D3 du VWF qui inhibent la fixation du FVIII au VWF endogène. La molécule contient également deux polypeptides XTEN, qui prolongent la demi-vie du FVIII en limitant son élimination par les reins (Seth Chhabra et al., 2020).

III-2 - Traitements n'impliquant pas le FVIII

En plus de la faible demi-vie du FVIII obligeant les patients à être traités plusieurs fois par semaine, l'injection du FVIII induit une réponse immunitaire se traduisant par l'apparition d'anticorps anti-FVIII neutralisants d'isotype IgG, appelés « inhibiteurs ». La présence d'inhibiteurs rend l'injection de FVIII inefficace pour traiter ou prévenir les épisodes de saignement. Il faut alors avoir recours à d'autres stratégies thérapeutiques qui permettent de rétablir la génération de thrombine et la formation de caillot en absence de FVIII.

III-2.A - Agents contournant l'activité du FVIII (« Bypass agents »)

Des agents permettant un effet hémostatique, en contournant les besoins en FVIII ont donc été développées. Ces agents « by-passants » sont extrêmement efficaces (80-90% d'efficacité) pour gérer les épisodes de saignements aigus et les saignements au long terme chez les patients présentant des inhibiteurs (Key et al. 1998; Negrier et al. 1997). Cependant, une variabilité de réponse a été démontrée. Elle est attribuée à des facteurs concernant les patients comme la localisation des saignements et l'âge. De plus, une augmentation des risques de thromboses a été détectée chez des patients âgés ou présentant des comorbidités.

III-2.A1 - Concentré de facteurs du complexe pro-thrombotique activés

La première approche utilisée dans le traitement des hémorragies de patients avec inhibiteurs, consiste dans l'injection de complexe pro-thrombotique activés (FEIBA™). Ce produit dérivé de plasma, contient de la prothrombine, du FVIIa, FIX, FX, et des traces de FV, FVIII, FIXa, FXa et thrombine (Turecek et al. 2004). FEIBA™, qui a démontré une excellente capacité à gérer les saignements des patients avec inhibiteurs (Astermark et al. 2006a; Hilgartner et al. 1990; Negrier et al. 1997), est utilisé en prophylaxie (50-100U/kg deux fois par semaine) (Antunes et al. 2014; Ewing et al. 2015). Dû à la complexité de sa composition, il est difficile d'isoler son mécanisme d'action. Une explosion de génération de thrombine a été observée, après l'administration de FEIBA™ sur des plasmas de patients présentant une déficience pour un facteur de coagulation, à l'exception du FV. Ce résultat démontre que le site d'action de FEIBA™ est le complexe prothrombinase, de la voie qui convertit la prothrombine en thrombine en présence de FVa, initiant ainsi les premiers caillots de fibrine (Turecek et al. 1999, 2003; Varadi et al. 2016). L'effet rétroactif de la thrombine permet également l'activation des autres acteurs de la coagulation (Varadi et al. 2016). Enfin, FEIBA™ agit également en fournissant du FXa, qui après interaction avec le FV endogène, clive la prothrombine en thrombine (Turecek et al. 2004).

III-2.A2 - FVII recombinant activé (rFVIIa)

La coagulation est initiée par la fixation du TF au FVII, formant un complexe FVIIa/TF qui active à son tour le FX jusqu'à la formation de fibrine. Le rationnel original était donc d'utiliser le FVIIa comme activateur du FX, sans avoir recourt au complexe FIXa/FVIIIa, contournant ainsi les besoins en FVIII. Le FVIIa est une enzyme formée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère, liées de façon covalente et provenant d'une même chaîne peptidique. Tandis que la chaîne légère permet la fixation du facteur au TF et ancre le FVIIa aux phospholipides en surface des plaquettes, la chaîne lourde, porte l'activité catalytique et fixe le FX (Banner et al. 1996; Shobe et al. 1999). Dès la fin des années 1980, le FVIIa fût utilisé pour traiter les saignements des patients hémophiles avec inhibiteurs, en absence ou lors d'actes chirurgicaux (Hedner et al. 1988; Ingerslev et al. 1996), à raison de 90 µg/kg toutes les 2-3 heures ou de 270 µg/kg /jour (Kavakli et al. 2006). Ces doses supra physiologiques représentent près de 250 fois la concentration retrouvée chez un individu sain, soulevant la question du mécanisme d'action de cette molécule. Cette question est toujours sujet à débat, et actuellement plusieurs hypothèses s'opposent, notamment quant au rôle du TF dans le

mécanisme d'action du rFVIIa. En condition physiologique, la concentration en FVII excède largement celle du FVIIa, et le FVII entre en compétition avec le FVIIa pour la fixation du TF (Rao & Rapaport 1996). L'injection d'une forte concentration de rFVIIa pourrait donc s'avérer nécessaire pour entrer en compétition avec le FVII endogène (van 't Veer et al. 2000). De plus, le FVII joue un rôle de régulateur négatif dans la génération de thrombine : la présence de fortes concentrations en FVIIa pourrait surpasser l'effet négatif du FVII. Enfin, les hautes doses de FVIIa administrées pourraient favoriser l'activation de FX en surface des plaquettes de manière TF-indépendante (Bom & Bertina 1990; Monroe et al. 1997).

L'administration de ces fortes doses de FVIIa étant bien tolérées par les patients ce produit a été testé en prophylaxie. Une nette diminution des saignements fût observée sans induire d'effets secondaires (Konkle et al. 2007).

III-2.A3 - Anticorps bispécifique anti FIXa et FX

L'efficacité des traitements décrit ci-dessus (FEIBA, FVIIa) n'est pas optimale, et des injections répétées sont nécessaires au maintien de la coagulation à cause de leur faible demi-vie. De plus, tous les patients ne réagissent pas de la même manière à l'injection de ces molécules ou complexes moléculaires, et certains peuvent développer des thromboses.

Emicizumab est un anticorps IgG4 humanisé bispécifique, liant et rapprochant le facteur IXa et le facteur X, mimant ainsi le rôle de cofacteur du FVIII. À l'inverse du FVIII qui circule sous forme inactive puis est protéolysé après son activation, emicizumab ne nécessite pas d'activation et n'est jamais inactivé. Son activité dépend néanmoins de la présence de phospholipides, ce qui circonscrit probablement son activité aux sites de saignements. L'action de cet anticorps humanisé est insensible à la présence d'inhibiteurs du FVIII (Kitazawa et al. 2012). De plus, emicizumab est peu immunogène, avec 0,75% des patients développant des anticorps anti-drogue (Harkins Druzgal et al. 2020; Valsecchi et al. 2021). L'utilisation d'emicizumab a considérablement amélioré la qualité de vie des patients hémophiles A sévères, en réduisant et simplifiant l'administration du traitement (sous cutané au lieu d'intraveineux), et en réduisant la fréquence des traitements (toutes les deux ou trois semaines au lieu de 2-3 fois par semaine). Bien que l'injection en prophylaxie d'emicizumab (3mg/kg/semaine) permet d'atteindre une activité estimée de FVIII de 9%, transformant ainsi une hémophilie A sévère en hémophilie mineure (Ferrière et al. 2020), elle ne permet pas de rétablir entièrement l'hémostase. Cependant, l'utilisation d'emicizumab permet une réduction de 87% des épisodes de saignements, par rapport à une réduction de 79% des

épisodes de saignements obtenus lors de l'utilisation en prophylaxie d'agent « by-passant » chez des patients hémophiles A sévères présentant des inhibiteurs (Oldenburg & Levy 2017).

En cas de saignements aigus ou de chirurgie, le recours à un traitement substitutif ou l'utilisation d'agent by-passant est nécessaire, selon la présence ou l'absence d'inhibiteurs (Jiménez-Yuste et al. 2021). L'utilisation d'emicizumab en combinaison avec des facteurs de complexes pro-thrombotiques activés (pendant plus de 1 jour et à 100U/kg) a été associée au développement de thrombose et de microangiopathies thrombotiques chez certains patients ; mais l'utilisation de ces facteurs à des doses plus faibles semble éviter ce problème (Kizilocak et al. 2021). Pour finir, rien ne suggère que l'utilisation de l'emicizumab seul induise de tels événements thrombotiques (Oldenburg & Levy 2017).

III-2.B - Inhibition des inhibiteurs de la coagulation

Le cycle de coagulation est un processus hautement régulé. De nombreux mécanismes agissant comme filet de sécurité, empêchent l'extension ou l'activation inadapté de la coagulation, nous protégeant ainsi de la formation de caillots sanguins. Cette régulation est assurée par les inhibiteurs de la coagulation : l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI), l'antithrombine, et les protéines C et S. L'observation d'un phénotype atténué chez des patients hémophiles A portant des mutations pro-thrombotique, a suggéré que l'inhibition des anti-coagulants endogènes pourrait rétablir la coagulation (Franchini et al. 2009; Franchini & Mannucci 2017). Pour cela, deux approches sont en cours d'étude. La première consiste en l'administration d'anticorps dirigés contre TFPI, et la seconde cible l'antithrombine à l'aide d'un ARN interférant (siRNA).

III-2.B1 - Anti-TFPI

Le TFPI agit comme une boucle de rétroaction négative de la cascade de coagulation, en inactivant dans un premier temps le FXa via son domaine K2, puis, grâce à son interaction avec le FXa, le complexe TF-FVIIa via son domaine K1 (Rao et al. 1995). Afin de rétablir la génération de FXa et donc de la thrombine, des IgG4 ciblant les domaines K2 ou K1 et K2 du TFPI ont été générées compensant l'absence de FVIII. Bien que cette thérapie soit basée sur des IgGs, une injection par jour est nécessaire, car leurs fixations de haute affinité à leur cible affecte leurs pharmacocinétiques (effet de disposition de médicaments avec médiation par cible) (Eichler et al. 2019; Parng et al. 2019). Parmi certains candidats, les essais cliniques ont dû être stoppés pour cause de thrombose (BAY1093884 NCT03597022) (Mahlangu 2021). Cependant, Marstacimab et Concizumab tous deux dirigés contre le domaine K2, sont

actuellement, ou ont passé, la phase III d'essais cliniques pour une utilisation en prophylaxie (NCT05145127 et NCT04083781) (Chowdary et al. 2015; Kwak et al. 2020). Les anti-TFPI ne sont pas conseillés dans le traitement des saignements aigus spontanés, ils doivent donc être associés avec un traitement standard le temps de la résolution de l'hémorragie. À ce jour, les résultats d'études d'effet synergique entre les anti-TFPI et le rFVIIa sont toujours débattus (Lauritzen et al. 2019).

III-2.B2 - ARN interférant (siRNA) anti-antithrombine

L'antithrombine est un inhibiteur de protéase à serine (Serpine), qui inactive de manière irréversible la thrombine, le FXa et, en moindre mesure le FIXa, le FXIa et le FXIIa (Hepner & Karlaftis 2013). Afin de rétablir la coagulation chez les patients hémophiles A, un ARN interférant, Fitusiran, ciblant les transcrit du gène SERPINC1 codant pour l'antithrombine a été généré (Sehgal et al. 2015). Les siRNA étant très stables, une molécule peut cibler de nombreux transcrits sur plusieurs semaines. Ainsi, seule une injection par mois serait nécessaire au maintien de la coagulation. Les essais cliniques ont démontré que l'injection de Fitusiran, augmente la génération de thrombine se traduisant par une réduction de 89% des saignements chez les patients hémophiles A avec et sans inhibiteurs (NCT03417245) (*Les données de deux études de phase III montrant que le fitusiran réduit significativement les saignements chez les personnes atteintes d'hémophilie A ou B, avec ou sans inhibiteurs, ont été présentées au Congrès de l'ASH - Sanofi*). Tout comme pour les anti-TFPI, Fitusiran seul n'est pas conseillé dans le traitement des épisodes hémorragiques spontanés, où là encore, des concentrés de facteurs de coagulation s'avèrent nécessaires. Il est important de noter que des épisodes thrombotiques entraînant le décès des patients, ont été observés suite aux injections répétées de hautes doses de FVIII chez des patients sous traitement au Fitusiran (Machin & Ragni 2018).

III-3 - Thérapie cellulaire

Les LSEC sont l'un des types cellulaires impliqué dans la sécrétion de FVIII. Au cours d'une récente étude, Gage et ses collaborateurs ont généré des LSEC dérivées de cellules souches pluripotentes humaines. La transplantation de ces cellules chez des souris immunodéficientes, était suivi par une sécrétion de FVIII humain, et, quatre mois après la transplantation, ce niveau atteignait 15% dans le plasma. Afin de déterminer si la transplantation de cellules pouvait rétablir la coagulation chez des souris hémophiles A, les

LSEC ont été injectées dans la veine porte ou dans la rate de souris adultes et nouveau-nés hémophiles A. Quelques semaines après la transplantation, une expression durable de FVIII fonctionnel, dépendant de la quantité de cellules injectées, était détectée réduisant significativement les temps de saignements chez ces souris (Gage et al. 2022). Bien que cette thérapie soit prometteuse, elle ne règle pas le problème des inhibiteurs, elle devrait donc être proposée en première instance de traitement chez les patients naïfs. De plus, les niveaux de FVIII fonctionnel retrouvés pourraient ne pas suffire lors d'acte chirurgicaux majeurs.

III-4 - Thérapie génique

Bien que les thérapies de substitution et les molécules « by-passantes » aient considérablement amélioré la qualité de vie des patients hémophiles A, les traitements sont chroniques tout au long de la vie des patients. L'hémophilie A étant une maladie génétique, la thérapie génique offrirait une solution durable au problème. L'une des méthodes permettant de délivrer le gène codant le FVIII dans les cellules de patients, est l'utilisation de vecteurs viraux. Deux types de vecteurs viraux peuvent être utilisés : les vecteurs rétroviraux dont le génome s'intègre au génome de la cellule hôte, et les vecteurs viraux adéno-associés (AAV) dont le génome ne s'intègre pas ou très peu.

III-4.A - Vecteurs AAV

La facilité avec laquelle des particules AAV peuvent être générées en absence des gènes viraux et en sélectionnant leur tropisme, avec le fait que ces virus soient non-pathogènes, a fait que leur utilisation a été largement favorisée dans le cadre des traitements de l'hémophilie A.

Les vecteurs AAV ne pouvant contenir des génomes de plus de 5 kb au risque de diminuer leur efficacité, l'insertion du gène codant le FVIII, de 7 kb, s'est avérée un vrai défi (Wu et al. 2010). L'utilisation d'un gène codon optimisé codant le FVIII BDD, et de promoteurs courts induisant l'expression du transgène dans le foie, ont permis de réduire la taille du génome à 4,4 kb (McIntosh et al. 2013; Ward et al. 2011). L'utilisation d'un vecteur non-intégratif engendrait le risque de perdre le transgène au cours des divisions cellulaires. Cependant, son utilisation est adaptée dans le cas de l'hémophilie A, les hépatocytes des adultes ayant un cycle cellulaire lent (Schmucker & Sanchez 2011). À l'inverse, chez les jeunes patients, les hépatocytes prolifèrent rapidement pouvant mener à la perte du transgène au cours des divisions cellulaires. L'utilisation de vecteur viraux non-intégratifs n'est donc pas

recommandé chez les enfants, chez qui l'édition de gènes ou l'utilisation de vecteurs intégratifs seraient préférables. Au cours de notre vie, nous sommes exposés aux AAV. Des anticorps anti-AAV capables de neutraliser les vecteurs viraux sont donc retrouvés chez 20 à 90% de la population selon le sérotype, l'âge et la nationalité ; et même de faibles titres d'anticorps neutralisants suffisent à réduire l'expression du transgène (Hurlbut et al. 2010; Jiang et al. 2006; Klamroth et al. 2022; Manno et al. 2006; Scallan et al. 2006). De plus, des lymphocytes T (LT) CD8⁺ mémoires spécifiques des protéines de capsides des AAV, peuvent éliminer les cellules transduites. En plus de l'immunité naturelle contre les AAV, les vecteurs eux-mêmes peuvent induire des réponses immunitaires, induisant ainsi des anticorps anti-AAV chez des patients préalablement séronégatifs (Manno et al. 2006; Nathwani et al. 2011). Enfin, la thérapie génique reposant sur l'expression et la synthèse de FVIII endogène, l'ensemble des patients présentant des inhibiteurs n'est pas éligible à ce traitement. Cependant, certaines études pré-cliniques chez le chien et la souris hémophiles A ont démontré un effet pro-tolérologène de la thérapie génique, ouvrant la porte de la thérapie génique médiée par les AAV aux patients présentant des inhibiteurs (Finn et al. 2010; Merlin et al. 2017, 2019; Sabatino et al. 2011).

Des vecteurs AAV de divers sérotypes ont été utilisés lors de différents essais cliniques. Une augmentation stable et durable du niveau de FVIII a été détectée chez l'ensemble des patients, quel que soit le vecteur utilisé, avec un effet dose dépendant. Une réduction des saignements a été constatée et les patients ont vu leur phénotype sévère évoluer vers un phénotype léger voire normal. À ce jour, le candidat le plus avancé, BMN 270 (Biomarin®), est en essai clinique de phase IIIb (NCT04323098). Dans plusieurs de ces essais cliniques, l'augmentation d'alanine transaminase a été détectée mais un traitement à base de stéroïdes permet d'éviter le développement d'effets secondaires sérieux et la perte du transgène (BioMarin Pharmaceutical 2022; Perrin et al. 2019; Rangarajan et al. 2017). Une compréhension de cet effet s'avère néanmoins nécessaire. De plus, la question de la durée d'efficacité du traitement reste à élucider.

III-4.B - Vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux présentent de nombreux avantages face aux vecteurs AAV, comme une capacité à contenir un génome de 8 à 10 kb et l'intégration de leur génome dans le génome de la cellule cible (Kumar et al. 2001). Dans un essai clinique, un vecteur lentiviral Pleightlet (MUT6) contenant le gène du FVIII sous un promoteur spécifique des plaquettes,

est utilisé pour transduire *ex vivo* des cellules souches hématopoïétiques qui sont ensuite réinjectées aux patients hémophiles A (Kuether et al. 2012; Shi et al. 2007). À ce jour, ce candidat a passé la phase I de l'essai clinique (NCT03818763).

III-4.C - Plaquettes transfectées

À l'heure actuelle, les patients ayant développé des inhibiteurs sont exclus du traitement par thérapie génique. C'est dans l'optique de résoudre ce problème, que la transfection de plaquettes avec un vecteur codant le FVIII sous un promoteur plaquettaire a été développée. En plus de stocker le FVIII dans leurs granules, et donc de limiter les interactions avec les inhibiteurs, les plaquettes permettent une production et sécrétion de FVIII directement au site de saignement (Shi et al. 2003).

Malgré l'ensemble des thérapies présentées ci-dessus, la solution durable et permettant un rétablissement complet de la coagulation reste l'induction de tolérance envers le FVIII thérapeutique.

IV - Modèles expérimentaux de l'hémophilie A

Le développement de thérapies innovantes, demande des études pré-cliniques qui doivent être réalisées sur des modèles animaux avant d'être applicables à l'Homme. L'utilisation de modèles animaux présentant la pathologie pour laquelle nous souhaitons développer une thérapie, nous permet d'identifier les risques qu'elle représente et son efficacité. Dans le cas de l'hémophilie A, la nécessité de comprendre les mécanismes impliqués dans le développement d'une réponse immunitaire contre le FVIII thérapeutique, ainsi que le besoin de nouveaux traitements efficaces au long terme, justifient l'utilisation d'animaux modèles. Évidemment, l'utilisation d'animaux modèles présentent plusieurs limitations comme des métabolismes différents, et surtout l'étude de réponses immunitaires chez l'animal dirigées contre des protéines humaines. Par exemple, la demi-vie du FVIII humain est beaucoup plus courte dans la circulation murine que chez l'Homme. Malgré ces limitations, les modèles pré-cliniques d'hémophilie A nous ont permis d'avoir une meilleure compréhension de la pathologie humaine.

IV-1 - Modèles d'hémophilie A spontanée

L'intérêt majeur des modèles d'hémophilie A spontanée est qu'ils présentent des phénotypes hémorragiques clairs.

IV-1.A - Chiens

Le premier modèle animal d'hémophilie A spontanée, découvert à la fin des années 1940 aux Etats-Unis, est un setter irlandais. Chez ces animaux, le déficit total en FVIII est causé par une inversion de l'intron 22 du gène *F8* (Lozier et al. 2002). Une colonie de chien hémophiles A, a donc été générée à partir de ces individus (Brinkhous & Graham 1950; Graham & Buckwalter 1949). Les chiens présentent une hémophilie A sévère, se caractérisant comme chez l'Homme par des saignements spontanés dans les tissus mous, des hémarthroses et occasionnellement des saignements dans les muqueuses ; et les saignements sont traités par l'injection de plasma ou de FVIII canin (Sabatino et al. 2009).

Une seconde colonie de chiens hémophiles A, a été établie au Canada en 1980 à partir d'un schnauzer nain présentant également une inversion de l'intron 22 et une absence totale de FVIII circulant (Giles et al. 1982). En plus de cette inversion, deux mutations ponctuelles (Gly909Ser et Leu1184Pro) ont été identifiées. Les chiens de la colonie canadienne présentent un taux d'inhibiteurs bien supérieur à la colonie américaine, ce qui suggère qu'un

polymorphisme rare peut augmenter le risque de développement d'une réponse alloimmune anti-FVIII (Tinlin et al. 1993).

Les chiens hémophiles A ont surtout été utilisés en modèles pré-cliniques pour étudier l'efficacité des produits thérapeutiques basés sur le FVIII, la thérapie génique à l'aide de vecteurs AAV ou de plaquettes, et les thérapies basées sur l'utilisation d'agents « by-passant » (Du et al. 2013; Margaritis et al. 2009).

IV-1.B - Moutons

En Suisse, une espèce de mouton blanc des Alpes est porteuse d'une hémophilie A sévère, avec les mêmes symptômes que ceux retrouvés chez l'Homme et le chien. Les animaux affectés présentaient l'insertion d'un nucléotide, décalant le cadre de lecture, et provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'exon 14 du gène *F8* (Neuenschwander et al. 1992; Neuenschwander & Pliska 1994; Porada et al. 2010). Ces moutons ont permis l'avancée des thérapies cellulaires, et l'étude des réponses immunitaires contre les AAV (Porada et al. 2011; Tellez et al. 2013).

IV-1.C - Rats

Une souche de rats, WAG/RijYcb, a été identifiée comme hémophile A car elle développait des hémorragies anormales. Il s'avérait que le gène *F8* portait une mutation substitutive dans le domaine A1 du FVIII. A l'inverse des Hommes et des autres espèces animales utilisées comme modèle pré-cliniques, l'hémophilie A n'est pas liée au chromosome X chez les rats, le gène *F8* étant localisé sur le chromosome 18. À ce jour, les domaines immuno-dominants du FVIII de rats n'ont pas été identifiés. Ces deux raisons font que les rats hémophiles A spontanés ne sont pas un modèle adéquat dans l'étude de l'hémophilie A (Booth et al. 2010a,b).

IV-2 - Modèles d'hémophilie A génétiquement induite

IV-2.A - Cochons

Un des problèmes majeurs avec les modèles souris d'hémophilie A, est la rapide élimination du FVIII humain dans la circulation murine. Une alternative possible est l'utilisation de modèle d'hémophilie A spontanée comme les chiens et les moutons, mais leur différence avec l'Homme en termes de physiologie, et de développement et progression de maladie complique les analyses. Les cochons étant d'excellent modèles pour l'étude des pathologies humaines, et leur système de coagulation étant très similaire à celui des Hommes (Bendixen

et al. 2010; Chen et al. 2009; Lunney 2007; Massicotte et al. 1986; Reverdiau-Moalic et al. 1996), un modèle d'hémophilie A porcin a été généré (Kashiwakura et al. 2012). Le modèle a été généré à l'aide d'un vecteur contenant une cassette de résistance néomycine ciblant le gène *F8* porcin, et plus précisément l'exon 16, au sein de fibroblastes embryonnaires par la suite injectés dans des ovocytes. Les cochons issus des ovocytes présentent moins de 1% de FVIII fonctionnel et développent des hémorragies spontanées. Ce modèle peut se montrer utile dans l'étude du développement d'arthropathies liées à l'hémophilie A, qu'ils développent naturellement après la naissance (Kashiwakura et al. 2012). Néanmoins, à ma connaissance, aucune étude n'a eu recours à ce modèle ou n'a été publiée.

IV-2.B - Rats

Le modèle rat d'hémophilie A spontanée n'étant pas caractérisé, deux modèles génétiquement induit ont été générés. En plus d'avoir un cycle de reproduction similaire à la souris, sa taille plus importante permet de répéter les prélèvements sanguins plus aisément. Le premier modèle de rats hémophiles A, a été généré sous le fond Sprague-Dawley par l'utilisation de nucléases clivant l'exon 16 du gène *F8*, provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau du domaine A3 du FVIII. Cette délétion se traduit par une absence totale de FVIII fonctionnel ; les rats développent donc des saignements spontanés dans les membres antérieurs et postérieurs, conférant un réel avantage en terme de similitude avec la pathologie humaine en comparaison aux modèles murins (Nielsen et al. 2014). Ils développent également une réponse immunitaire similaire à celle de l'Homme après l'injection de FVIII thérapeutiques (Lövgren et al. 2016). Ce modèle a été par exemple utilisé dans l'étude d'arthropathies induites par l'hémophilie A (Sørensen et al. 2016), et dans l'étude de traitements « by-passants » (Knudsen et al. 2021).

Le second modèle de rat hémophile A génétiquement induit, est de fond génétique Dalh. La quasi-totalité du gène *F8* a été inversé par la technologie CRISPR/Cas9, provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré. Aucune activité du FVIII n'a été détectée chez ces rats, qui développent des hémorragies spontanées dans les tissus mous, les articulations, et les muscles. Enfin, une réponse immunitaire anti-FVIII est détectée dès la seconde injection de FVIII thérapeutique. Ce modèle a été utilisé pour tester une thérapie restaurant les niveaux de FVIII fonctionnel et prévenant les saignements spontanés (Shi et al. 2020b).

IV-2.C - Souris

L'utilisation de souris dans le cadre de recherches scientifiques est plus commode du fait de leur taille, de leur faible coût, et de leur cycle de génération court. Aucune race de souris naturellement hémophiles A n'ayant été découverte, le laboratoire de Kazazian généra deux modèles de souris, sous le fond génétique hybride B6x129sv, invalidées pour le gène *F8*. Il généra deux souches de souris où il inséra une néo-cassette interrompant l'exon 16 (souris E16) ou une néo-cassette interrompant l'exon 17 (souris E17) respectivement. Bien que ces souris n'arborent aucun FVIII circulant, elles ne développent pas ou rarement de saignements spontanés. Les expériences de « tail clip », au cours desquelles les queues des souris sont coupées laissant le sang s'écouler, sont néanmoins létales si les blessures ne sont pas cautérisées. Ce phénotype présente par ailleurs l'avantage de rendre possible les prélèvements successifs dans la veine rétro-orbital, sans mettre en danger la souris (Bi et al. 1995, 1996). Quelques temps après leur génération, les souris E16 ont été rétro-croisées avec des souris C57BL/6 ou Balb/c (Kootstra et al. 2003; Waters et al. 2009).

Il a été démontré que leur réponse immunitaire après des injections successives de FVIII humain, était similaire à la réponse immunitaire anti-FVIII retrouvée chez les patients hémophiles A (Qian et al. 1999). Néanmoins, à l'inverse des Hommes où 30% des patients développent des inhibiteurs, plus de 80% des souris traitées au FVIII humain en développent (Wu et al. 2001). Cela s'explique par le fait que ces souris présentent toutes la même anomalie génétique conduisant au développement d'hémophilie A, tout en étant sous un fond génétique identique, ce qui n'est pas le cas chez l'Homme. Les sous classes d'IgGs développées correspondent néanmoins à celles développées par l'Homme. La seconde limitation, est que la réponse immunitaire développée dépend directement de la souche de souris utilisée. En effet les réponses développées par les souris sous fond C57BL/6 sont plus robustes, avec un taux d'anticorps développé plus important que celles développées par les souris hémophiles A sous fond génétique Balb/c (Qadura et al. 2011). Les souris hémophiles A C57BL/6 ont largement été utilisées pour le développement de thérapie basée sur le FVIII, ou de protocoles d'induction de tolérance (Scott et al. 2013).

Afin d'étudier de manière plus précise la mise en place d'une réponse immunitaire contre le FVIII humain, la souche de souris E17 a été croisée par le groupe de Birgit Reipert avec un modèle présentant un CMH II humain (HLA-DRB1*1501). Bien que cet haplotype ne représente qu'une partie de la population, il a été associé avec un plus haut risque de

développement d'inhibiteurs (Oldenburg et al. 1997; Pavlova et al. 2010). Ces souris ont d'ailleurs permis d'identifier des peptides immuno-dominants du FVIII conduisant au développement d'inhibiteurs, et de caractériser l'interaction LT, CMH II et FVIII (Steinitz et al. 2012).

Enfin, l'hémophilie A sévère étant dans 45% des cas causée par une inversion de l'intron 22 au sein du gène F8, un nouveau modèle de souris portant cette mutation a récemment été généré. Ces souris, de fond génétique C57BL/6, ont été générées par la technique de CRISPR/Cas9. Elles présentent une hémophilie A sévère et développent des saignements spontanés dans les poumons, dans le foie et en sous-cutanés (Han et al. 2021).

L'hémophilie A étant causée par de nombreuses mutations, le développement de différents modèles pré-cliniques avec différents types de mutations nous permettra d'être au plus proches des conditions médicales humaines.

J'ai d'ailleurs moi-même utilisé des souris C57BL/6 invalidées dans l'exon 16 du gène *F8* afin de mener mon projet de recherche à bien. J'ai également développé et caractérisé au cours de ma thèse un nouveau modèle de souris d'hémophilie A mineure.

V - Complication des traitements substitutifs

V-1 - Réponse allo-immune dirigée contre le FVIII

Le développement d'anticorps anti-drogue, représente une réelle complication dans le traitement de nombreuses pathologies et l'hémophilie A ne fait pas exception. En effet, les patients hémophiles A traités par thérapie de substitution avec du FVIII, développent des allo-anticorps neutralisants. Bien que le développement d'anticorps anti-drogue concerne 1 à 5 % des patients en règle générale, étonnamment, dans le cas de l'hémophilie A, jusqu'à 30% des patients sont concernés selon la sévérité de la maladie. De plus, l'ensemble des thérapies de substitution est administrée par voie intraveineuse, qui est d'ordinaire une route non immunogène (Büttel et al. 2011). Ces anticorps polyclonaux, généralement de sous-types IgG4 et IgG1, sont développés durant les 10 à 15 premiers jours cumulés de traitement et neutralisent la fonction pro-coagulante du FVIII, rendant les injections de FVIII thérapeutique inefficaces (Reding et al. 2002; Whelan et al. 2013).

Ces inhibiteurs sont quantifiés dans le plasma de patients à l'aide d'un test dit « Bethesda-Nijmegen modifié ». Le titre inhibiteur, exprimé en unité Bethesda (BU) par millilitre de plasma, représente la dilution de plasma de patient nécessaire pour que 50% de FVIII fonctionnel contenu dans du plasma sain soient inhibés (Kasper et al. 1975; Verbruggen et al. 1995). Selon leur niveau d'expression d'inhibiteurs, les patients sont divisés en deux groupes : les patients fort-répondeurs avec inhibiteurs élevés (>5 BU/mL) et les patients faibles-répondeurs avec inhibiteurs <5 BU/mL. Tandis que les IgG1 sont présentes au sein des patients à haut et faible titre d'inhibiteurs, les IgG4 sont plus fréquemment présentes chez les patients à fort taux d'inhibiteurs (Whelan et al. 2013).

Le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre le FVIII ne se produit pas exclusivement chez les individus hémophiles A. En effet, des IgGs anti-FVIII non neutralisantes ont été retrouvées à la fois chez des patients avec et sans inhibiteurs, mais également chez 20% d'individus ne présentant aucun troubles de la coagulation (Algiman et al. 1992; Gilles & Saint-Remy 1994; Whelan et al. 2013). Ces IgGs sont principalement de la sous-classe des IgG1, et elles sont d'une affinité cent fois plus faible que les IgGs neutralisantes retrouvées chez les patients avec inhibiteurs (Hofbauer et al. 2015; Schweiger et al. 2022). Chez certains patients traités à de nombreuses reprises, ces anticorps non-neutralisants peuvent altérer la demi-vie du FVIII (7,8 heures contre 10-12 heures) (Hofbauer et al. 2016). La présence d'anticorps non-

neutralisants peut favoriser l'apparition d'anticorps neutralisants chez les patients naïfs, n'ayant jamais reçu de FVIII, après une thérapie de substitution (Cannavò et al. 2017). Étant principalement dirigés contre le domaine B du FVIII, qui nous le rappelons est fortement glycosylé, ces anticorps non-neutralisants ne sont peut-être pas strictement spécifiques du FVIII (Whelan et al. 2013). Des IgGs neutralisantes du FVIII ont par ailleurs été retrouvées chez des individus sains (Moreau et al. 2000). Des IgM et des IgA spécifiques du FVIII ont également été détectées chez les patients et les individus sains (Gilles et al. 1998; Shapiro 1967). De plus, des LT CD4⁺ reconnaissant le FVIII ont également été retrouvés au sein de donneurs sains, à une fréquence similaire à celle des LT CD4⁺ spécifiques pour les antigènes du non-soi (Hu et al. 2003, 2007; Kamaté et al. 2007; Meunier et al. 2017b; Reding et al. 2000). La présence aussi importante de LT CD4⁺, aussi bien naïfs que mémoires, capables de réagir *in vitro* avec le FVIII, pourrait expliquer la présence d'anticorps anti-FVIII chez les individus sains (Meunier et al. 2017b).

La réponse immunitaire induite par la thérapie de substitution, est une réponse immunitaire classique dirigée contre une protéine du non-soi. Comprendre les mécanismes associés avec le développement d'inhibiteurs pourrait permettre de prévenir leur formation.

V-1.A - Endocytose du FVIII

La zone marginale de la rate confère un environnement propice à l'initiation de réponse immunitaire, son rôle étant de filtrer les antigènes provenant du sang. Le FVIII ne fait pas exception à la règle, et son injection à des souris hémophiles A est suivie de son accumulation dans la zone marginale de la rate (André et al. 2009; Navarrete et al. 2009). Cette zone, entourant la pulpe blanche, est riche en cellules immunitaires innées telles que des cellules dendritiques et des macrophages impliqués dans la capture d'antigènes et leur présentation aux LT CD4⁺ naïfs présents dans la pulpe blanche.

La réponse immunitaire anti-FVIII débute par son internalisation par les cellules dendritiques, les macrophages ou les lymphocytes B (LB) présents dans la zone marginale (Lai et al. 2018a; Navarrete et al. 2009; Zerra et al. 2017). Le type cellulaire impliqué dépend directement de si le patient a déjà généré une réponse anti-FVIII. En effet, lors de la première rencontre entre le système immunitaire et le FVIII, l'hypothèse la plus probable est que le FVIII soit internalisé par des cellules dendritiques, qui agissent en cellules sentinelles, ou des macrophages de la zone marginale plutôt que des LB exprimant des récepteur B (BCR) spécifiques du FVIII dont le nombre est très faible (Archambault et al. 2013). À l'inverse, lors

de la réintroduction de l'antigène, il pourrait être internalisé par des LB mémoires spécifiques du FVIII via leur BCR qui présentent alors les peptides aux LT CD4⁺ via le CMH II.

Plus précisément, les cellules dendritiques et les macrophages de la zone marginale de la rate, ont été associés à l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII (Navarrete et al. 2009; van Schooten et al. 2008). De plus, il a été montré *in vitro* à l'aide de cellules humaines, que les cellules dendritiques dérivées de monocytes capturent et présentent le FVIII aux LT CD4⁺, mais l'internalisation est réduite en présence de VWF (Dasgupta et al. 2007a; Herczenik et al. 2012).

L'étude de l'implication des LB dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII a généré des résultats contradictoires. En effet, des LB de la zone marginale de la rate, exprimant un BCR poly-réactif, ont été associés à l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII chez la souris, en facilitant le transport du FVIII vers les follicules B et les zones de la rate riches en cellules dendritiques et LT CD4⁺ (Zerra et al. 2017). Néanmoins, le fait que l'inhibition de la tyrosine kinase de Bruton, une enzyme essentielle à l'activation, la prolifération et la survie des LB, n'altère pas la mise en place de la réponse immunitaire anti-FVIII chez la souris, suggère que les LB de la zone marginale ont un rôle moindre dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII (Delignat et al. 2019). Le transport de l'antigène par les macrophages, et potentiellement les LB, de la zone marginale vers les régions riches en cellules dendritiques de la rate est une étape clé de l'initiation de la réponse anti-FVIII (Navarrete et al. 2009).

En plus de s'accumuler dans la rate, le FVIII exogène est rapidement détecté dans le foie après injection. Au sein de cet organe, les cellules endothéliales sinusoidales (LSEC) et les cellules de Kupffer ont été identifiées comme internalisant le FVIII et le VWF (Swystun et al. 2018; van Schooten et al. 2008). Ces deux populations par ailleurs, expriment des récepteurs d'endocytose du FVIII (Swystun et al. 2018). Enfin, les cellules endothéliales, qui sont des cellules présentatrices d'antigènes non hématopoïétiques pouvant exprimer le CMH II, ont été décrites comme présentant le FVIII aux LT CD4⁺ folliculaires chez la souris (Shi et al. 2020a).

Au vu de sa faible concentration en circulation et de sa taille, le FVIII est probablement internalisé par les cellules présentatrices d'antigènes uniquement via des récepteurs spécifiques d'endocytose (Figure 6). Ces récepteurs reconnaissent des motifs protéiques spécifiques. En circulation, le FVIII est associé au VWF, aussi les récepteurs d'endocytose du FVIII doivent être capables de reconnaître des motifs exposés sur le VWF ou le FVIII lui-même. À ce jour de nombreux récepteurs d'endocytose du FVIII reconnaissant tantôt le FVIII, tantôt

le VWF, ou les deux molécules, ont été identifiés (Bovenschen et al. 2003, 2005; Dasgupta et al. 2007a, 2008; Herczenik et al. 2012; Lenting et al. 1999; Pegon et al. 2012; Repessé et al. 2012; Swystun et al. 2018). Les domaines C1 et C2 du FVIII sont particulièrement impliqués dans l'endocytose du FVIII, ce qui est consistant avec le fait que la présence du VWF, qui masque les domaines C1 et C2, limite cette endocytose (Dasgupta et al. 2007b; Gangadharan et al. 2017; Herczenik et al. 2012; Wroblewska et al. 2012). L'endocytose ne conduit néanmoins pas toujours à la présentation du FVIII par les molécules du CMH, en fonction du lieu de l'internalisation, du microenvironnement cellulaire, du type cellulaire, et du récepteur impliqué (Lai et al. 2016).

Finalement, seuls les récepteurs CD206, un récepteur de sucre à mannoses exposées (Martinez-Pomares et al. 2001), et Stabiline-2 (ou HARE), un récepteur « scavenger » exprimé par les cellules endothéliales du foie et de la rate (Zhou et al. 2000), ont été impliqués dans l'endocytose et la présentation du FVIII en présence du VWF chez l'Homme (*in vitro*) et la souris, respectivement (Dasgupta et al. 2007a; Repessé et al. 2012; Swystun et al. 2018).

Dans le cas d'une réponse immunitaire secondaire, chez des patients ayant déjà développés des anticorps anti-FVIII, ou chez des individus présentant naturellement des anti-FVIII, l'internalisation de ce dernier peut avoir lieu sous forme de complexes immuns via des FcγRs exprimés en surface des cellules dendritiques (Hartholt et al. 2017; Vollack et al. 2017; Yada et al. 2003), via les récepteurs d'endocytose du complexes FVIII/VWF, ou encore via le BCR des LB mémoires spécifiques du FVIII, générés lors de la réponse primaire (Figure 6). L'implication des FcγRs dans le développement *de novo* d'anticorps anti-FVIII chez des individus ayant déjà développé des IgGs anti-FVIII, est néanmoins sujet à débat. En effet, l'équipe de Meeks a démontré que le développement *de novo* d'anti-FVIII au sein de souris hémophile A ayant déjà formé des IgGs anti-FVIII et étant invalidées pour les FcγRs était identique à celle des souris non-invalidées pour les FcγRs (Zerra et al. 2020).

V-1.B - Présentation antigénique

Tout comme l'ensemble des réponses immunitaires adaptatives, l'étape majeure consiste en la présentation de peptides antigéniques par des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles aux lymphocytes TCD4⁺.

Lors de l'endocytose d'un antigène, les CPA doivent détecter un signal de danger pour maturer et promouvoir sa présentation aux LT (Matzinger 1994). La difficulté supplémentaire

dans la lutte contre le développement d'inhibiteurs, est que la réponse immunitaire anti-FVIII, qui semble de prime abord être une réponse contre le non-soi classique, présente des particularités. En effet, malgré un grand nombre d'investigations, il fût impossible d'identifier un signal de danger associé à la présentation du FVIII. Précisément, le FVIII ne pouvant ni activer les récepteurs Toll-like (TLR), ni faire maturer des cellules dendritiques, il ne peut être considéré lui-même comme un signal de danger (Pfistershammer et al. 2006; Teyssandier et al. 2013). L'état inflammatoire des patients, influencé par les saignements répétés, les hémarthroses, et l'exposition à des virus ou bactéries lors d'infections ou vaccinations ne procure pas plus de signal de danger (Dimitrov et al. 2010; Lai et al. 2016; Peyron et al. 2015; Platokouki et al. 2018).

Après son internalisation, le FVIII est découpé en peptides par des protéases endosomales, et chargé sur les molécules du CMH II (van Haren et al. 2011, 2013). La présence du VWF, module le répertoire de peptides de FVIII présentés par le CMH II (Sorvillo et al. 2016). L'ensemble des domaines du FVIII sont représentés au sein des peptides chargés sur le CMH II (Jankowski et al. 2019; Moise et al. 2012; van Haren et al. 2011), et parmi eux, certains ont été identifiés comme épitopes T (Ettinger et al. 2010; James et al. 2007; Jones et al. 2005; Pratt et al. 2004; Reding et al. 2004; Steinitz et al. 2012). Par ailleurs, la prédiction *in silico* de l'affinité des peptides pour le CMH II est un bon prédicteur de l'immunogénicité de ces derniers (Jankowski et al. 2019; Pashov et al. 2014; Shepherd et al. 2015).

Le complexe CMH II/peptides est ensuite relocalisé en surface de la CPA, qui migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles interagissent avec les LT CD4⁺ (Figure 6).

V-1.C - Réponse T

L'implication des LT dans la réponse immunitaire anti-FVIII fut préalablement suggérée par l'observation de la disparition des inhibiteurs chez des patients, auparavant inhibiteurs positifs, après leur infection par le virus de l'immunodéficience humaine et la disparition de leur LT CD4⁺ (Bray et al. 1993). De plus, la réponse immunitaire anti-FVIII, caractérisée par le développement d'IgGs anti-FVIII ayant subi des hyper-mutations somatiques, plaide en faveur d'une aide des LT CD4⁺ dans la maturation de cette réponse immunitaire. En effet, pour réaliser la commutation de classe et les maturations d'affinités nécessaires à la génération d'IgGs, les LB requièrent l'aide des LT CD4⁺ (Fulcher et al. 1987; Jacquemin et al. 1998, 2000a; van den Brink et al. 2000). Le troisième indice suggérant l'implication des LT dans l'immunité anti-FVIII, est l'absence de développement d'inhibiteurs lors de traitement avec un anticorps

anti-CD40 ligand (CD40L), une molécule de co-stimulation exprimé par les LT activés et impliquée dans la maturation des cellules dendritiques et des LB (Ewenstein et al. 2000; Miao et al. 2006; Qian et al. 2000; Reipert et al. 2001; Rossi et al. 2001). De même, l'utilisation d'un anticorps anti-CTLA-4, une molécule exprimée sur les LT activés, et permettant la modulation de leur réponse par les T reg, a permis de prévenir l'apparition d'inhibiteurs durablement chez des souris et des rats hémophiles A (Miao et al. 2006; Øvlisen et al. 2022).

L'exposition au FVIII, n'induit ni chez les patients hémophiles A ni au sein des modèles murins hémophiles A de réponse cytotoxique médiée par les LT CD8⁺. Néanmoins, les LT CD4⁺, et plus précisément des lymphocytes T CD4⁺ folliculaires spléniques, sont essentiels à la mise en place de la réponse anti-FVIII, en apportant l'aide nécessaire à l'activation et différenciation des LB folliculaires (Jing et al. 2019). Par ailleurs, les lymphocytes auxiliaires de type 1, de type 2 et de type 17 (Th1, Th2 et Th17), ont également été impliqués dans la génération d'inhibiteurs (Ettinger et al. 2009; Reding et al. 2002). En particulier, les Th1 et Th17 ont été détectés chez un patient hémophile A au stade précoce du développement de la réponse immunitaire anti-FVIII, tandis que la formation de Th2 était détectée plus tard chez ce même patient (Ettinger et al. 2009). En effet, les Th2 sécrètent des cytokines telles que l'IL-4 promouvant, entre autre, la différenciation des LB et la sécrétion d'anticorps (Burdin et al. 1995; Constant & Bottomly 1997; Malisan et al. 1996).

Les LT naïfs exprimant un récepteur T (TCR) spécifique du FVIII, et présents dans les organes lymphoïdes secondaires, interagissent avec les CPA ayant internalisé le FVIII. Le premier signal d'activation des LT CD4⁺, est l'interaction entre le TCR et le CMH II arborant des peptides du FVIII. Des tests d'activation de LT, et même l'isolation de clones T spécifiques du FVIII de patients hémophiles A, ont d'ailleurs démontré que les domaines A2, A3, C1 et C2 du FVIII étaient représentés au sein des peptides reconnus par les LT CD4⁺ spécifiques du FVIII, faisant de la réponse T une réponse polyclonale. Les épitopes immuno-dominants ont par ailleurs été identifiés à la fois chez l'Homme et la souris hémophile A (Ettinger et al. 2010, 2016; Hu et al. 2004; Jacquemin et al. 2003b; James et al. 2007; Reding et al. 2000, 2003, 2004; Steinitz et al. 2012).

L'interaction des molécules de co-stimulation CD40 avec CD40L, et CD80/86 avec CD28 confère le second signal d'activation des LT CD4⁺ (Qian et al. 2000; Reipert et al. 2001; Rossi et al. 2001). Enfin, la sécrétion de cytokines leur apporte le dernier signal d'activation, de

prolifération et de différenciation. Les LT naïves se différencient alors en cellules effectrices Th1, Th2, TH17 ou Treg (Figure 6).

V-1.D - Réponse B

Après leur activation, les Th1 et Th2 migrent vers les follicules B afin d'interagir avec les LB naïfs spécifiques du FVIII, ayant internalisé le FVIII via leur BCR. La formation de la synapse B-T confère les signaux nécessaires à l'activation, la prolifération et la différenciation des LB naïfs. Tandis qu'une partie de ces LB se différencie en cellules sécrétrices d'IgMs de basse affinités spécifiques du FVIII, le reste des cellules subit une affinité de maturation et une commutation isotypique puis se différencie en LB mémoires spécifiques du FVIII (Georgescu et al. 2016; Jing et al. 2019; Lai & Lillicrap 2017). Les cellules sécrétrices (plasmocytes) à longue durée de vie, s'installent dans la moelle osseuse pour maintenir une réponse humorale sur de potentiellement longues périodes.

Les LB mémoires, jouent un rôle particulièrement important dans le maintien de la réponse immunitaire anti-FVIII car, résidant dans la zone marginale de la rate ; ils sont en contact direct avec leur antigène. Chez l'Homme, près de 40% des cellules B circulantes ont un phénotype mémoire (Klein et al. 1998; Spencer et al. 1998).

Tandis que la première réponse immunitaire contre le FVIII implique des LT et LB naïfs, la réintroduction de l'antigène, menant à une seconde réponse, implique des LB mémoires spécifiques du FVIII. Ces cellules reconnaissent leur antigène grâce à leur BCR spécifique du FVIII, le « processent » et le présentent via le CMH II aux LT CD4⁺ spécifiques du FVIII. L'interaction des LB mémoires avec les LT CD4⁺, leur confère de nouveaux les signaux de prolifération, et de différenciation en cellules sécrétrices d'IgGs de hautes affinités spécifiques du FVIII (Georgescu et al. 2016) (Figure 6).

En plus d'agir sur les cellules naïves, les LT CD4⁺ activés restimulent également les cellules B mémoires spécifiques du FVIII formées lors d'une précédente réponse immunitaire (Hausl et al. 2004).

Une disparité existe entre les sous-classes d'IgGs retrouvées chez les patients hémophiles A avec inhibiteurs et les individus sains présentant des anticorps anti-FVIII. En effet, les patients hémophiles A développent des IgG4 et IgG1 mais peu d'IgG2 et IgG3, et les individus sains des IgG3 et IgG1 uniquement. Les IgG4 sont donc exclusivement retrouvées chez les patients hémophiles A avec inhibiteurs (Hofbauer et al. 2015; Whelan et al. 2013). Chez la souris hémophile A en revanche, l'ensemble des sous classes d'IgGs sont représentées

au sein des anticorps inhibiteurs (Healey et al. 2007; Meeks et al. 2007). De plus, l'affinité des anticorps retrouvés chez les patients avec inhibiteurs persistants, est bien supérieure à l'affinité des anticorps chez les patients sans inhibiteurs ou chez les individus sains (Hofbauer et al. 2015). Ces inhibiteurs ciblent préférentiellement les domaines A2 et C2, bien que des anticorps dirigés contre les domaines a3, A3 et C1 soient également décrits (Fulcher et al. 1985; Scandella et al. 1988, 1989, 1993, 2001). Les IgGs anti-FVIII sont dites neutralisantes lorsqu'elles interfèrent avec l'activité pro-coagulante du FVIII, en ciblant les domaines clés impliqués dans l'interaction avec le VWF, les phospholipides ou encore les facteurs IIa, IX et X de la coagulation (Barrow et al. 2001; Fijnvandraat et al. 1998; Foster et al. 1990; Lenting et al. 1996; Lollar et al. 1994; Ronayne et al. 2021; Saenko et al. 1994; Scandella et al. 1995; Shima et al. 1991; Zhong et al. 1998). Des anticorps non-neutralisants sont également développés par les patients ou les individus sains. Ces anticorps ciblent des épitopes non impliqués dans la fonction du FVIII.

Chez les patients hémophiles A sévères comme chez les individus sains, certains de ces anticorps sont pourvus d'une activité catalytique de type sérine protéase, neutralisant le FVIII en le protéolysant à de multiples sites (Lacroix-Desmazes et al. 1999, 2000, 2002, 2003). Cette protéolyse du FVIII peut engendrer la génération d'épitopes qui sont ensuite présentés aux LT CD4⁺ par les cellules présentatrices d'antigènes (Lacroix-Desmazes et al. 2008).

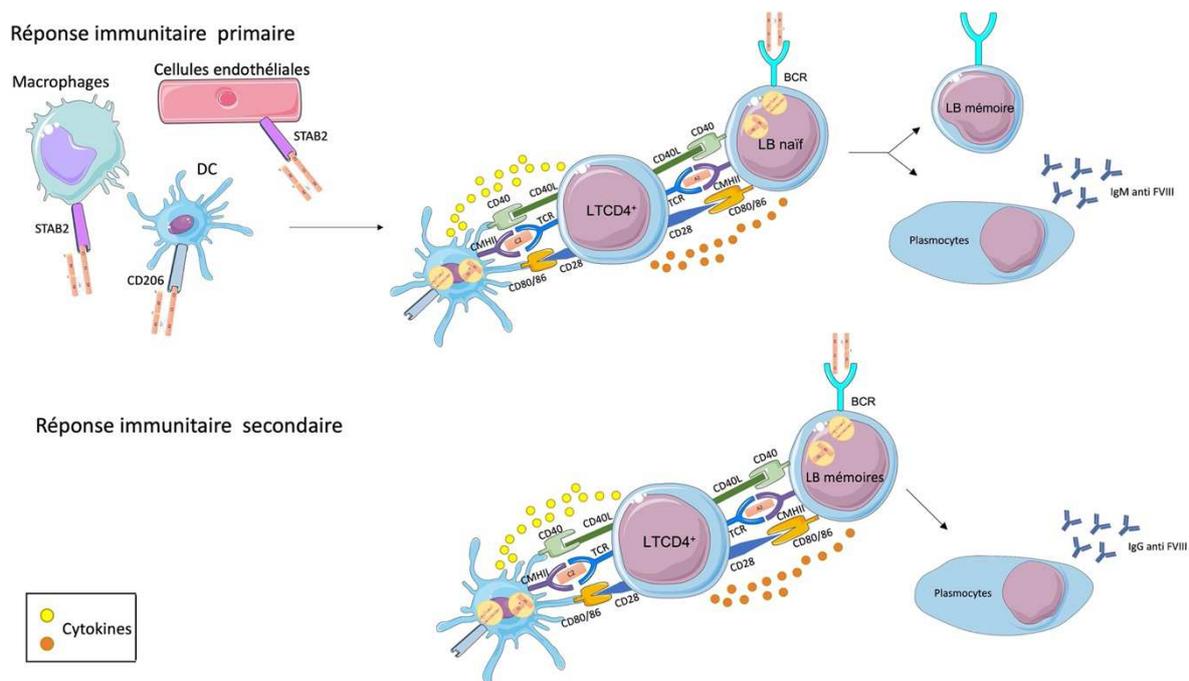


Figure 6 **Réponse immunitaire anti-FVIII.** Le FVIII est dans un premier temps internalisé par les macrophages et les cellules dendritiques de la rate, et par les cellules endothéliales et les macrophages du foie via des récepteurs d'endocytose du FVIII. Une fois internalisé par les CPA, le FVIII est protéolysé en peptide et présenté via le CMH II aux LT naïfs. L'expression de molécule de co-stimulation (CD80/86 et CD40) ainsi que la sécrétion de cytokines permet l'activation et la différenciation des LT naïfs en LT CD4⁺ effecteurs. Dans un même temps, des LB naïfs qui ont internalisés le FVIII via leur BCR et présentent les peptides issus du FVIII via le CMH II, interagissent avec les LT CD4⁺. La formation de la synapse immunologique entre le LB et le LT CD4⁺ permet l'activation des LB naïfs en LB mémoires ou en plasmocytes sécréteurs d'IgMs spécifiques du FVIII. Lors d'une seconde rencontre avec FVIII, les LB mémoires peuvent directement agir en CPA après internalisation du FVIII via leur BCR spécifique. L'interaction des LB mémoires avec les LT CD4⁺ leur permet de se différencier en plasmocytes sécréteurs d'IgGs de hautes affinités. Une partie de cette figure a été dessinée en utilisant des images provenant de Servier Medical Art.

V-2 - Absence de tolérance centrale et périphérique

La mise en place d'une réponse T et B anti-FVIII repose sur l'absence ou la perte d'une tolérance centrale et/ou périphérique. Cela concerne en particulier les patients dont la mutation induit une absence totale de la protéine. Chez ces patients, les épitopes du FVIII ne peuvent pas être présentés aux lymphocytes T présents dans le thymus. Le défaut de présentation de peptides dérivés du FVIII dans les organes lymphoïdes primaires lors de l'ontogénie B et T, fait échouer l'éducation du système immunitaire. De manière générale, une mauvaise éducation du système immunitaire résulte en l'absence de génération de cellules régulatrices spécifiques de l'antigène, et la persistance de clones auto-réactifs (Nemazee 2017; Takaba & Takayanagi 2017). La tolérance centrale reste néanmoins imparfaite envers le FVIII, et même chez des individus sains, des LT spécifiques du FVIII peuvent être retrouvés en périphérie, ce qui est consistant avec la présence d'anticorps anti-FVIII chez ces individus (Hu et al. 2003; Jacquemin et al. 2003b; Meunier et al. 2017b; Moreau et al. 2000; Reding et al. 2000; Whelan et al. 2013). Sur la base des travaux réalisés par Meunier et ses collaborateurs,

l'hypothèse de notre groupe de recherche est qu'il n'y a en fait pas ou peu de tolérance centrale T envers le FVIII, y compris chez les individus sains.

La tolérance périphérique, qui a lieu dans les tissus périphériques dont les ganglions lymphatiques, est un système complémentaire à la tolérance centrale pour moduler ou inhiber les réponses immunitaires. En effet, la présentation de peptides du soi par des cellules dendritiques non-matures à des clones auto-réactifs retrouvés en périphérie, conduit à leur anergie ou délétion. En plus de ce mécanisme, les cellules régulatrices présentes en périphérie modulent l'activation des cellules auto-réactives (Bayry et al. 2007; Lim et al. 2005; Misra et al. 2004; Valdor & Macian 2010; Xing & Hogquist 2012). En effet, la déplétion des cellules T régulatrices (Treg) CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺ au sein de cellules mononuclées périphériques sanguines de donneurs sains, induisait leur prolifération en présence de FVIII. De plus, des souris hémophiles A sur-exprimant FoxP3, ne développent pas d'inhibiteurs, ce qui démontre l'importance des Treg dans le maintien de la tolérance au FVIII (Kamaté et al. 2007; Miao et al. 2009). De nombreuses évidences ont démontré que les cellules dendritiques, selon leur état de maturation et de différenciation, peuvent également induire une tolérance plutôt qu'une réponse immunitaire lors de la présentation antigénique, faisant d'elles des actrices de la tolérance périphérique. (Mueller 2010; Ohnmacht et al. 2009). Dans le cas du FVIII, des cellules dendritiques provenant souris hémophiles A ont été différenciées *ex vivo* en DC tolérogènes, puis transduites pour exprimer le FVIII humain. La réinjection de ces DC chez des souris hémophiles A ayant ou non développé une réponse anti-FVIII auparavant, supprimaient la réponse T anti-FVIII et le développement d'inhibiteurs (Su et al. 2011).

Dans le cas de personnes hémophiles A avec inhibiteurs, des clones T allo-réactifs exprimant un TCR de faible affinité pour le FVIII et ayant échappé à la délétion ou l'inactivation, peuvent apporter l'aide nécessaire à l'activation des LB spécifiques du FVIII. Dans le cas des individus sains, qui présentent également des LT spécifiques du FVIII, le FVIII n'est pas ignoré par le système immunitaire mais la réponse immunitaire anti-FVIII est contrôlée pour éviter le développement d'auto-réactivité. Le fait que le développement d'inhibiteurs dépend d'une absence de tolérance, a été suggéré par le cas d'un patient hémophile A sévère présentant une délétion de plusieurs exons dans le gène *F8*, et ayant eu une induction de tolérance immunitaire (ITI) qui a échoué (voir la partie Induction de tolérance envers le FVIII thérapeutique) (Ettinger et al. 2016). Cet individu présentait un inhibiteur persistant. Deux tétramères correspondant au CMH II HLA-DRA-DRB1*10 :01 et HLA-DRA-

DRB1*01 :01, les deux allèles exprimés par ce patient, ont été chargés avec des peptides correspondant aux domaines A2, C1 et C2 du FVIII. Étonnamment, bien que la réponse anti-FVIII soit polyréactive, seul un épitope fût reconnu par les tétramères et la diversité clonale des LT CD4⁺ reconnaissant cet épitope était faible. Ces résultats suggèrent que lors du processus d'ITI les LT CD4⁺ spécifiques du FVIII sont probablement anergisés ou éliminés, et qu'en cas d'échec de l'ITI, un clone ou quelques clones peuvent subsister, transformant une réponse polyclonale en mono/oligoclonale (Ettinger et al. 2016).

Un dernier système de sécurité contre le développement d'une hémophilie A auto-immune existe chez les individus sains présentant des anticorps anti-FVIII. En effet, des anticorps anti-idiotypiques bloquant l'interaction entre les anticorps anti-FVIII et le FVIII ont été détectés dans le plasma d'individus sains (Dietrich et al. 1992; Gilles et al. 1996, 2004; Gilles & Saint-Remy 1994; Sakurai et al. 2004).

V-3 - Facteurs de risques favorables au développement d'inhibiteurs

Les facteurs influençant l'immunogénicité des produits biopharmaceutiques sont généralement associés au type d'administration du traitement (la voie d'administration, la durée du traitement et le nombre d'injections), au patient (maladie, fonctionnalité du système immunitaire, état du système inflammatoire, facteurs génétiques, âge...), et aux propriétés du médicament (système d'expression/production, modification post-traductionnelles, impuretés, agrégats...). Dans le cas de l'hémophilie A, la plupart des inhibiteurs se forment entre les 10 et 15 premiers jours cumulés d'exposition du patient au FVIII, et pour une hémophilie A sévère cela concerne 20 à 30% des patients (van den Berg et al. 2019). Plusieurs facteurs de risques ont été associés avec le développement de ces inhibiteurs.

V-3.A - Facteurs liés au patient

V-3.A1 - Facteurs génétiques liés au FVIII

L'un des facteurs de risques affectant le plus le développement d'inhibiteurs est directement lié aux mutations du gène *F8*. Comme dit précédemment, l'hémophilie A est causée par diverses mutations. Les mutations touchant le gène *F8* ont été classées en deux catégories : les mutations nulles caractérisées par une absence totale de la protéine (larges délétions, mutations non-sens) ; et les mutations causant une perte de fonction ou une sécrétion amoindrie de la protéine (petites délétions/insertions, mutations aux sites d'épissage, mutations faux-sens et inversion de l'intron 22) (Oldenburg et al. 2002).

Comme attendu, le risque de développement d'inhibiteurs est plus important chez les personnes ayant des mutations causant une complète absence du FVIII, la présence des épitopes du FVIII en cas de mutations conduisant à la formation d'une protéine non-fonctionnelle pouvant induire une tolérance au moins partielle. En effet, tandis que les mutations nulles sont associées avec une prévalence du développement d'inhibiteurs de plus de 30%, le second groupe de mutations est associé avec une risque de développement d'inhibiteurs de moins de 10% (Goodeve et al. 2000; Gouw et al. 2012; *HAMSTeRS - Database Commons*). Plus précisément, les patients affectés par la délétion de multiples exons sont considérés à plus haut risque de développer des inhibiteurs (88%) que les patients n'ayant une délétion que d'un seul exon (25%). Les mutations non-sens et faux-sens localisées dans la chaîne légère ont été associées avec un plus fort risque de développement que les mutations localisées dans la chaîne lourde (*HAMSTeRS - Database Commons*; Oldenburg & Pavlova 2006). Enfin, les mutations faux-sens touchant les sites d'épissage sont considérées comme à faible risque de développer des inhibiteurs (Spena et al. 2018).

Par ailleurs, deux personnes hémophiles A présentant les mêmes mutations au sein du gène *F8* peuvent présenter des différences de développement d'inhibiteurs, suggérant l'implication d'autres facteurs contribuant au développement d'une réponse immunitaire (Ettinger et al. 2010).

V-3.A2 - Facteurs génétiques non liés au gène F8

En plus des mutations touchant le gène *F8*, les mutations touchant les acteurs de la réponse immunitaire peuvent être liées au développement d'inhibiteurs.

La première étape de la mise en place de la réponse immunitaire anti-FVIII, est l'internalisation et la présentation de l'antigène. L'étude des polymorphismes d'un nucléotide (SNP) au sein du gène codant le CMH II a démontré que les variants HLA-DRB1*1501, HLA-DQB1*0602, HLA-DQA1*0102, HLA-A3, HLA-B7, HLA-C7 et HLA-DR15 étaient plus fréquemment exprimés chez les patients ayant développé des inhibiteurs (Hay et al. 1997; Oldenburg et al. 1997; Pavlova et al. 2009).

Lors de la mise en place de la réponse B, de nombreuses cytokines interviennent. Des SNP au sein des promoteurs des gènes codant l'IL-1 β , l'IL-4, l'IL-10 et le TNF α ayant été associés au développement de maladies auto-immunes, ont été explorées dans le cadre du développement d'inhibiteurs dans l'hémophilie A. Des polymorphismes au sein des promoteurs des gènes codant la cytokine pro-inflammatoire TNF α , et la cytokine anti-

inflammatoire IL-10, ont été associées avec le développement d'inhibiteurs (Astermark et al. 2006b,c; Lee et al. 2006; Pavlova et al. 2009). Certains de ces polymorphismes, induisent une surexpression de ces cytokines chez des patients atteints par des maladies auto-immunes et même chez les individus sains (Bouma et al. 1996; Huang et al. 1999). Néanmoins, différentes études menées par l'équipe de J. Astermark ont généré des résultats contradictoires concernant l'association de la surexpression de ces cytokines avec un risque plus important de générer des inhibiteurs (Astermark et al. 2013). Les cytokines agissant généralement en association, il est difficile d'isoler un mécanisme de fonctionnement influençant la génération d'inhibiteurs. Plus tard, des SNP découverts au sein des gènes codant l'IL-1, l'IL-2 et l'IL-12 ont été associés à la formation d'inhibiteurs (Lozier et al. 2011).

Une fois encore, l'observation d'une réduction de réponse immunitaire chez les patients présentant une thyroïdite de Hashimoto, une sclérose en plaque, ou encore une maladie de Grave, ayant un polymorphisme dans le promoteur du gène CTLA4, suggéra l'implication de ce gène dans la réponse immunitaire anti-FVIII. Cette mutation pourrait conférer un effet protecteur contre le développement d'inhibiteurs chez les patients hémophiles A sévères (Astermark et al. 2007).

La démocratisation des technologies de séquençage, a permis d'analyser le génotype de cohorte de patients afin d'identifier le fond génétique associé au développement d'inhibiteurs. De ces études est ressorti que des SNP au sein des gènes *PDGFRB* (récepteur β aux facteurs de croissance dérivé des plaquettes), *PCGF2* (protéine polycomb 2), *HSP90B1* (endoplasmine), *F13A1* (Facteur XIII), *IGSF2* (CD101), *ALOX5AP* (protéine FLAP), *MAP2K4* (protéine kinase kinase 4 activé par mitogène) et *PTPRN2* (tyrosine phosphatase N2) étaient associés à un moindre développement d'inhibiteurs. À l'inverse, certains SNP au sein des gènes *CD44*, *CSF1R* (colony stimulating factor 1 receptor), *DOCK2*, *MAPK9* (protéine kinase 9 activé par mitogène) et *IQGAP2* (protéine analogue à l'activation des Ras GTPase) étaient associés à une augmentation du risque de développer des inhibiteurs (Astermark et al. 2013).

Enfin, l'insertion de séquences microsatellites au sein du promoteur du gène *HMOX1* codant l'hème oxygénase-1 (HO-1), a été retrouvée plus fréquemment au sein de patients avec inhibiteurs (Repressé et al. 2013). En effet, tandis que les longues répétitions GT ont été associées avec une diminution de l'expression de HO-1, les répétitions GT courtes, ont été associées avec une augmentation de l'expression de HO-1 (Brydun et al. 2007). Les patients ayant développé des inhibiteurs présentent généralement des répétitions GT plus longues.

L'association de ces facteurs au développement d'inhibiteurs reste néanmoins discutable, les résultats n'étant pas toujours reproductibles au sein des différentes cohortes de patients, ou la taille de ces cohortes étant faible (Repressé et al. 2013).

V-3.A3 - Voies d'oxydation

Les saignements caractérisant l'hémophilie A sont causés par un dommage de l'endothélium, provoquant la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que des espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Alom-Ruiz et al. 2008). Ces ROS altèrent la structure, la fonction et l'immunogénicité de nombreuses protéines (Hermeling et al. 2004; Trujillo et al. 2014; Weiskopf et al. 2010). Le FVIII localisé au site de saignement, est très certainement en contact avec les ROS. Leur interaction conduit à l'inactivation du FVIII par son oxydation (Stief et al. 2000). Tandis que l'utilisation de N-acétyl-cystéine, un anti-oxydant, avant l'injection de FVIII thérapeutique à de souris hémophiles A induit une réduction de la réponse immunitaire anti-FVIII, l'immunisation de souris avec un FVIII oxydé tend à augmenter la réponse immunitaire anti-FVIII (Peyron et al. 2018).

Les saignements sont responsables de l'hémolyse des globules rouges libérant de l'hémoglobine et de l'hème. Par ailleurs, HO-1 peut être induite à la fois par la présence d'hème et de ROS, libérés lors de dommages à l'endothéliums (Bancos et al. 2010; Ferrándiz & Devesa 2008). Cette enzyme est responsable de la dégradation de l'hème en ions ferreux, monoxyde de carbone et biliverdine (Schuller et al. 1999; Tenhunen et al. 1969). Il y a plusieurs années, le laboratoire a démontré que l'induction de l'expression d'un anti-inflammatoire, en l'occurrence HO-1, avant l'injection de FVIII chez des souris hémophiles A, était associée avec une réduction de la réponse immunitaire anti-FVIII ; avec à la fois une réduction de l'expression du CMH II en surface des cellules dendritiques et macrophages spléniques et une réduction de la réponse anti-FVIII des LT spléniques. Enfin le traitement des souris hémophiles A avec un composé capable de délivrer du monoxyde de carbone ou avec de la bilirubine, la biliverdine réduite, permettait une réduction de la réponse immunitaire anti-FVIII identique à celle obtenue après l'induction de HO-1 (Dimitrov et al. 2010).

V-3.A4 - Système du complément

Des études récentes ont évoqué l'implication du complément dans le développement d'inhibiteurs. En effet, l'administration du facteur de venin de cobra, connu pour dépléter de façon transitoire le C3 du complément (Fritzinger et al. 2009), avant l'injection de FVIII thérapeutique, conduisait à la réduction de génération d'IgGs anti-FVIII neutralisantes. De

plus, la décomplémentation de sérum diminuait l'internalisation du FVIII par des cellules dendritiques dérivées de monocytes et sa présentation à des LT CD4⁺ spécifiques du FVIII, démontrant ainsi l'implication du système du complément, ou au moins du C3, dans la mise en place d'une réponse immunitaire anti-FVIII (Rayes et al. 2018).

V-3.A5 - Voies métaboliques

L'interaction entre les voies métaboliques et le système immunitaire a été impliquée dans le développement de nombreuses pathologies (Pearce & Pearce 2018). Plus spécifiquement l'enzyme indoleamine 2,3 dioxygénase 1 (IDO1), impliquée dans le catabolisme du tryptophane, participe à l'induction de voies d'immuno-régulation dans de nombreux types cellulaires, dont les LT et les cellules dendritiques (Fallarino et al. 2006; Mellor & Munn 2004; van Baren & Van den Eynde 2015; Xie et al. 2015). L'expression de IDO1 par des souris hémophiles A, a été associée à une diminution de la prévalence des inhibiteurs, bien qu'elle n'inhibait pas complètement la génération de la réponse anti-FVIII. Cette réduction d'inhibiteurs était corrélée à une augmentation de l'apoptose des LT et une prolifération des LT diminuée (Liu et al. 2009). Au sein de la souris hémophile A, l'administration de fortes doses de CpG-ODN, un ligand du TLR9 régulant l'expression d'IDO, inhibait la différenciation des LB mémoires spécifiques du FVIII en cellules sécrétrices d'anticorps (Allacher et al. 2011). De plus, chez les patients hémophiles A sévères, l'activation dysfonctionnelle d'IDO1 en réponse à l'interaction CpG ODN/ TLR9 a été associée au développement d'inhibiteurs (Matino et al. 2015). Enfin, l'induction d'IDO1 chez des cellules dendritiques après l'injection de CpG ODN à des souris hémophiles A, prévenait l'apparition d'anticorps anti-FVIII et générait des cellules Tregs spécifiques du FVIII (Matino et al. 2015).

V-3.A6 - Cytokines et leurs récepteurs

Plusieurs études ont démontré l'implication des cytokines intervenant dans la communication entre les LT et les LB dans le développement d'inhibiteurs. En effet, les individus sains et les patients hémophiles A n'ayant pas développé d'inhibiteurs, présentent une sécrétion élevée de cytokines de type TNF α , IFN γ , IL-2 et IL-5 (Oliveira et al. 2013). Par ailleurs, les patients hémophiles A avec inhibiteurs établissent préférentiellement une réponse anti-inflammatoire avec une sécrétion augmentée d'IL-10 et d'IL-4. Un mécanisme a été proposé par les auteurs pour expliquer cette différence de réponse immunitaire entre les patients n'ayant pas développé d'inhibiteurs et ceux ayant développé des inhibiteurs. Chez les

patients n'ayant pas développé d'inhibiteurs, ou les individus sains, la réponse T anti-FVIII, caractérisée par la sécrétion de TNF α et d'IFN γ , est contrôlée par les LT sécrétant de l'IL-4 et par les LB sécrétant de l'IL-10 ; ce qui favorise la synthèse d'IgG1 anti-FVIII non-inhibitrices et inhibe le développement d'IgG4 anti-FVIII. À l'inverse, chez les patients hémophiles A avec inhibiteurs, l'établissement d'un environnement anti-inflammatoire par les neutrophiles et les monocytes, et la faible sécrétion de cytokines de la part des LB et des LT, favorise le développement d'IgG4 anti-FVIII inhibitrices (Chaves et al. 2010; Oliveira et al. 2013).

Récemment une nouvelle cytokine de la famille des TNF, BAFF, a été associée à la régulation de la génération et du maintien des inhibiteurs et/ou des LB spécifiques du FVIII. En effet, tandis que les patients hémophiles A ayant développé des inhibiteurs présentent une expression plus élevée de BAFF, une réduction de l'expression de BAFF a été remarquée chez les patients ayant eu une induction de tolérance fructueuse (Doshi et al. 2021). À l'aide d'un modèle de souris hémophiles A naïves, les mêmes auteurs ont démontré que l'utilisation d'un anticorps anti-BAFF avant leur immunisation avec du FVIII, permettait de prévenir de façon durable l'apparition d'inhibiteurs. De plus, chez des souris hémophiles A ayant déjà développé une réponse anti-FVIII, un traitement combinant des anticorps anti-BAFF et des anticorps anti-CD20 a permis une réduction du titre inhibiteur par l'inhibition des cellules B sécrétrices d'anticorps (Doshi et al. 2021).

V-3.A7 - Présence d'anticorps non-neutralisants

Nous avons exposé précédemment que les individus sains comme les patients hémophiles A peuvent développer des anticorps anti-FVIII sans activité neutralisante. La présence d'anticorps anti-FVIII non-neutralisants chez les patients naïfs, n'ayant jamais été traités avec du FVIII thérapeutique, a été décrite comme favorisant le développement d'inhibiteurs au sein de patients hémophiles A sévères naïfs (Cannavò et al. 2017). Les patients hémophiles A ayant des anticorps non-neutralisants développent des inhibiteurs non-transitoires. À l'inverse, les inhibiteurs développés par les patients sans anticorps non-neutralisants sont transitoires, et disparaissent dans les six premiers mois. L'apparition de ces anticorps non-neutralisants est d'ailleurs favorisée chez les patients présentant une mutation non-nulle du gène *F8*, et sécrétant du FVIII. La présence de ces anti-FVIII avant même le début du traitement substitutif, peut être liée à l'activation de LB naturels dirigés contre le FVIII (Cannavò et al. 2017). Ces résultats doivent néanmoins être confirmés.

V-3.A8 - Ethnicité

L'ethnie des patients a également été considérée comme impactant le développement d'inhibiteurs. Néanmoins, peu d'articles décrivent ce phénomène. Parmi les études traitant le sujet, les résultats sont contradictoires. D'un côté, la prévalence des inhibiteurs est deux fois supérieure chez les individus afro-américains et hispaniques par rapport aux individus caucasiens ; par contre, aucune différence statistique n'est notable excepté lorsque l'on compare des individus hispaniques à des individus non hispaniques (Leissing et al. 2011). D'ailleurs, les mutations du gène *F8* sont similaires au sein des cohortes de patients hispaniques, afro-américains et caucasiens (Miller et al. 2012).

V-3.B - Facteurs environnementaux

V-3.B1 - Sources de FVIII

La source de FVIII utilisée comme traitement de substitution impacte directement la formation d'inhibiteurs chez les patients hémophiles A. En effet, à la fois la pureté du FVIII dérivé de plasma, et les cellules de production du FVIII recombinant, ont été envisagées comme facteurs de risques au développement d'inhibiteurs (Aledort 2011; Gouw et al. 2013b; Lai et al. 2017). Plusieurs études, à l'aide de modèles animaux d'hémophilie A ou chez les patients, ont démontré que le pdFVIII était moins immunogène et générait moins de peptides présentés par les cellules présentatrices d'antigènes via le CMH II, que le FVIII recombinant (Behrmann et al. 2002; Delignat et al. 2007; Goudemand et al. 2006; Jankowski et al. 2019; Peyvandi et al. 2016). Cet effet est surtout observé chez les patients naïfs, n'ayant jamais reçu de FVIII, qui présentent 26,8 % d'inhibiteurs après traitement avec du FVIII dérivé de plasma contre 44,5% après traitement avec du FVIII recombinant (Peyvandi et al. 2016).

Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer la plus faible immunogénicité du pdFVIII. L'une des explications possibles est la persistance de molécules du plasma comme le VWF, des immunoglobulines, ou l'albumine, et du fibrinogène au sein du pdFVIII (D'Amici et al. 2011). En effet, la présence de VWF dans les préparations de FVIII a été associée à une réduction de la réponse immunitaire anti-FVIII chez des souris (Behrmann et al. 2002; Delignat et al. 2007) et chez des patients hémophiles A (Bravo et al. 2022; Peyvandi et al. 2016). L'hypothèse pouvant expliquer ce phénomène, est le fait que le VWF protège le FVIII de l'endocytose par les cellules présentatrices d'antigènes, et réduit ainsi sa présentation aux cellules effectrices (Dasgupta et al. 2007b).

Par ailleurs, l'implication de cytokines comme le « transforming growth factor β » (TGF β), dans la réduction de l'immunogénicité des produits dérivés de plasma a été évoquée (Hodge et al. 1999; Wadhwa et al. 1994)

Une autre hypothèse pouvant expliquer la plus faible immunogénicité du FVIII dérivé de plasma, est que les autres protéines plasmatiques entrent en compétition avec le FVIII pour l'internalisation par les cellules présentatrices d'antigènes, et la présentation antigénique. En plus de cela, la présence de lymphocytes Tregs spécifiques des autres molécules du plasma pourraient favoriser une suppression « bystander » sur les LT CD4⁺ spécifiques du FVIII (Lai et al. 2017).

En plus d'être plus immunogène que le pdFVIII, les différents rFVIII présentent des degrés d'immunogénicité différents selon les générations de produits recombinants créés. Leur immunogénicité est ainsi influencée par le type cellulaire produisant la protéine, et par les modifications post-traductionnelles que les produits recombinants subissent. Précisément, il a été démontré que les profils de glycosylations des FVIII recombinants différaient de celui du FVIII dérivé de plasma (Canis et al. 2018; Hironaka et al. 1992; Qu et al. 2020). De plus, une récente étude démontra qu'un plus grand nombre de peptides issus du FVIII est chargé sur le CMH II dans le cas du rFVIII que dans celui du pdFVIII, et ce indépendamment de la présence du VWF (Jankowski et al. 2019). De plus, les glycosylations varient selon les cellules utilisées pour la production : CHO (cellules d'ovaires de hamster de Chine), BHK (fibroblastes de rein de bébé hamster) et HEK (cellules de rein embryonnaire humain) (Goh & Ng 2018; Hironaka et al. 1992). Ces différences de glycosylations pourraient directement influencer l'immunogénicité des produits recombinants (Lai et al. 2018b). En effet, les produits recombinants issus des cellules BHK, ont été démontrés comme plus immunogènes que les produits recombinants issus des CHO et HEK (Lai et al. 2018b). L'effet du produit utilisé en traitement surpasse même l'effet de la mutation du gène *F8* dont souffrent les patients. En effet un patient affecté par une mutation non-nulle, donc dont le risque de développer des inhibiteurs est plus faible à l'origine qu'un patient touché par une mutation nulle, a le même risque de développer des inhibiteurs qu'un patient avec une mutation nulle lorsque tous deux sont traités avec des produits recombinants (Rosendaal et al. 2017).

L'agrégation de certains rFVIII, due à des modifications de glycosylations, provoque des changements de conformation de la protéine et a également été associée à une augmentation d'immunogénicité (De Cristofaro et al. 2019; Kosloski et al. 2009; Pital et al. 2012).

Enfin, une mauvaise sulfatation de la tyrosine 1680, indispensable à la fixation du FVIII au VWF, peut engendrer la perte de protection du VWF envers le FVIII, et ainsi favoriser son endocytose. De plus, l'absence de sulfatation engendre un changement de conformation de la protéine, facilitant son internalisation par les cellules présentatrices d'antigènes (Kannicht et al. 2013).

Plusieurs études ont démontré que le FVIII BDD est plus immunogène que le FVIII entier chez les patients préalablement traités avec du FVIII (Hassan et al. 2018). Cependant, le débat reste ouvert car il a également été démontré que l'endocytose du FVIII BDD ou du FVIII entier par des cellules dendritiques dérivées de monocytes était comparable, et que l'induction d'inhibiteurs chez des souris hémophiles A était équivalentes (Delignat et al. 2014).

Comme présenté précédemment, de nouvelles molécules recombinantes ont vu le jour dans le but d'améliorer la demi-vie du FVIII. Parmi ces molécules, le rFVIII simple chaîne, le FVIII-Fc et le FVIII-PEG n'ont pas été associés avec le développement de nouveaux inhibiteurs chez des patients préalablement traités avec du rFVIII (Mahlangu et al. 2014, 2016; Meunier et al. 2017a; Mullins et al. 2017; Stasyshyn et al. 2017; Young et al. 2015). En effet, il a été suggéré que le FVIII-PEG présente une immunogénicité réduite (Peng et al. 2011) probablement due à sa plus faible endocytose (Rottensteiner et al. 2007). Enfin, après une injection de BIVV001 chez des patients hémophiles A sévères préalablement traités avec du rFVIII, aucun inhibiteur n'a été développé (Konkle et al. 2020). Ces molécules ne sont donc a priori, pas plus immunogènes que les rFVIII originaux. Toutefois, les résultats d'essais cliniques chez des patients hémophiles A naïfs et les études rétrospectives qui feront suite à la mise sur le marché de ces produits, sont nécessaires pour pouvoir tirer des conclusions définitives.

V-3.B2 - Dosage du traitement

Il était auparavant pensé que les quantités de FVIII injectées étaient directement liées au développement d'inhibiteurs et que plus la quantité était élevée plus la réponse immunitaire anti-FVIII était intensive. En effet, les expériences originales faites chez la souris hémophile A par B. Reipert, avaient montré que l'injection de plus fortes doses de FVIII aux animaux se traduisait par des titres inhibiteurs supérieurs (Reipert et al. 2000). De même, des études rétrospectives ont montré que des traitements intensifs de bébés hémophiles A au moment de la naissance, représentait un risque accru du développement d'inhibiteurs plus tard dans la vie (Gouw et al. 2013a). Toutefois, l'observation d'une induction de tolérance par l'injection quotidienne de fortes doses de FVIII remet en question cette conclusion. La théorie

de la présence discontinue d'un antigène pourrait expliquer ce phénomène (Pradeu et al. 2013). Cette théorie suggère que l'introduction et la disparition continue d'un antigène est plus immunogène que présence constante de cet antigène (Calvez et al. 2018; Gouw et al. 2007; Maclean et al. 2011). Elle concorde parfaitement au cas du FVIII avec son injection à la demande ou tous les deux-trois jours et sa demi-vie de 12 heures.

V-3.B3 - Âge du premier traitement

L'impact de l'âge auquel le premier traitement substitutif est administré sur le développement d'inhibiteurs génère des résultats discordants. En effet les premières études, dans les années 2000, suggéraient qu'une administration de FVIII dans les 6 premiers mois après la naissance favorisait le développement d'inhibiteurs (Goudemand et al. 2006; Lorenzo et al. 2001; Santagostino et al. 2005; van der Bom et al. 2003). À l'inverse, les résultats générés plus récemment démontrent l'absence d'effet de l'âge du premier traitement dans la génération d'inhibiteurs (Calvez et al. 2018). Il est donc difficile de conclure quant à l'impact de l'âge sur le développement d'inhibiteurs. Les résultats étaient en fait compliqués par le fait que les traitements précoces se faisaient à forte doses (voir partie V-3.B2).

Nous pouvons conclure que l'ensemble de la population, affectée par l'hémophilie A ou non, développe une réponse anti-FVIII. Parmi elle, 70 à 95 % des patients hémophiles A traités avec du FVIII parviennent à contrôler cette réponse immunitaire et ne développent pas d'inhibiteurs. Lorsque l'on étudie les profils des patients ayant développé des inhibiteurs, nous remarquons que le type de mutations portées par les patients, au sein du gène F8 ou sur d'autres gènes, et la source de FVIII utilisée sont des prédicteurs relativement fiables de la génération d'inhibiteurs. Mais ces deux paramètres seuls, ne permettent pas d'expliquer l'absence de développement d'inhibiteurs dans le reste de la population. Ces individus parviennent probablement à contrôler leur réponse immunitaire anti-FVIII à l'aide de mécanismes de régulation immunologique tels que HO-1,IDO ou BAFF.

VI - Induction de tolérance immunitaire envers le FVIII thérapeutique

Nous avons vu précédemment que le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII repose sur l'absence de tolérance centrale et/ou périphérique envers le FVIII. En cas de tolérance défectueuse, le problème majeur auquel se confronte donc les patients, est le développement d'inhibiteurs, rendant inefficace les traitements substitutifs à l'aide de FVIII. L'alternative présentée à ces patients est l'utilisation de traitements « by-passants » visant à contourner les besoins en FVIII pour traiter les saignements. Ils ne suffisent cependant pas à rétablir suffisamment la coagulation lors d'actes chirurgicaux importants ou d'accidents hémorragiques majeurs. Ces thérapies ne décalent donc que le problème du développement des inhibiteurs chez les patients à qui l'injection de FVIII est indispensable. Une solution capable d'éradiquer les inhibiteurs, ou d'éviter leur apparition, serait donc souhaitable.

VI-1 - Suppression immunitaire

Une approche non-spécifique est l'élimination des LB et LT sans distinction de spécificité. L'utilisation d'anticorps monoclonaux thérapeutiques anti-CD20, anti-CD3 ou de complexes IL-2/anti-IL-2 a démontré un effet protecteur contre le développement d'inhibiteurs dans les modèles hémophiles A murins (Biswas et al. 2017; Liu et al. 2014; Peng et al. 2009; Scallan et al. 2006; Waters et al. 2009; Zhang et al. 2011). L'utilisation de la rapamycine, un inhibiteur de mTOR qui régule la prolifération cellulaire, permet l'élimination des LT effecteurs et favorise l'expansion des Tregs (Battaglia et al. 2005; Lu et al. 2010; Strauss et al. 2009; Wang et al. 2011b). Chez la souris hémophile A, l'administration de rapamycine avant une thérapie de substitution, inhibe l'apparition d'inhibiteurs induisant ainsi une tolérance envers le FVIII thérapeutique (Moghimi et al. 2011), et la combinaison de rapamycine et de la cytokine Flt3L (FMS-like receptor tyrosine kinase ligand) promeut la différenciation des LT en Tregs spécifiques du FVIII (Biswas et al. 2015).

La déplétion du système immunitaire adaptatif reste néanmoins une approche drastique pour inhiber le développement d'une réponse immunitaire envers le FVIII. Une approche plus spécifique est nécessaire.

VI-2 - Induction de tolérance immunitaire (ITI)

À ce jour, seuls les protocoles d'induction de tolérance immunitaire sont efficaces pour éradiquer les inhibiteurs à long terme. Les protocoles d'induction de tolérance reposent sur l'administration quotidienne, tous les deux jours, ou trois fois par semaine, de faibles ou fortes

doses de FVIII (protocole de Bonn 100-150 UI/kg deux fois par jour ; protocole Creveld 25 UI/kg tous les deux jours ...), pendant quelques mois à plus d'un an (Gruppo et al. 1992; Mauser-Bunschoten et al. 1995; Oldenburg et al. 1999; Rocino et al. 2006; Smith et al. 1999). Dans 70% des cas, les inhibiteurs sont éliminés durablement (Hay et al. 2012; Mariani et al. 2001). Différents FVIII thérapeutiques, dérivé de plasma ou recombinant, avec et sans VWF ont été utilisés.

Le succès de l'ITI est défini par une absence d'inhibiteurs, d'une demi-vie du FVIII supérieure à 6 heures, et d'une récupération de FVIII de plus de 66%. Au cours des années, plusieurs prédicteurs de succès de l'ITI ont été identifiés. Tout d'abord le type de mutation dont souffre le patient permet d'anticiper le succès de la procédure. En effet, si le patient présente une petite insertion ou délétion, ou une mutation faux-sens, ses chances de succès sont de 81% contre 47% en cas de larges délétions et mutations non-sens (Coppola et al. 2009). Ensuite, un pic historique du titre inhibiteur inférieur à 200 BU/mL, un titre maximal de 10 BU/mL au commencement de l'ITI, et un seuil inférieur à 10 BU/mL après deux ans de traitement, ont été associés avec de meilleures chances de succès de l'ITI (Coppola et al. 2009; Dimichele et al. 2007; Hay et al. 2012). Les interruptions pendant plus de deux semaines, puis les reprises successives du traitement, ont au contraire été associées avec un mauvais pronostic de l'ITI (Lenk 1999; Oldenburg et al. 1999). Ce résultat fait écho à la théorie de Pradeu qui énonce l'effet bénéfique sur l'induction de tolérance d'une présence constante d'un antigène, plutôt que sa disparition et apparition successives (Pradeu et al. 2013). La spécificité épitopique des IgGs anti-FVIII est également un paramètre influençant le résultat de l'ITI. En effet, les anticorps anti-domaines A1, A2 et C2 ont été associés à un mauvais pronostic (Lapalud et al. 2015; van Helden et al. 2010). Pour finir, la sous-classe d'IgG majoritaire retrouvée chez les patients, impacte les chances de succès de l'ITI. Un ratio d'inhibiteurs IgG4/IgG1 important est associé à un échec de l'ITI (Hofbauer et al. 2015; van Helden et al. 2008; Whelan et al. 2013).

Le mécanisme d'action de l'ITI n'est toujours pas totalement élucidé. Néanmoins, nous savons que les fortes doses de FVIII utilisées inhibent la réactivation des cellules B mémoires spécifiques du FVIII ; prévenant ainsi leur différenciation en cellules sécrétrices d'antigènes et induisant même leur apoptose chez l'Homme (Hausl et al. 2005; van Helden et al. 2007). De plus, lors de l'ITI, la formation d'anticorps anti-idiotypiques capables de bloquer les anticorps inhibiteurs a été associée à un succès du traitement (Gilles et al. 1996; Sakurai et al. 2004).

Malgré le taux de succès du traitement, les injections intraveineuses répétées sur une longue période, pouvant conduire au développement d'infections dans 80% des cas, ainsi que les coûts et la lourdeur du traitement, surtout en cas de mauvais pronostic, freinent les patients (Colowick et al. 2000; Dimichele et al. 2007; Rocino et al. 2016; Van Den Berg et al. 1998). Toutefois, une ITI couronnée de succès présente un bénéfice en termes de coût de traitement par rapport à l'utilisation de thérapies « by-passantes » (à la demande ou en prophylaxie) et elle apporte une meilleure qualité de vie aux patients (Earnshaw et al. 2015; Knight et al. 2003; Rasekh et al. 2011).

VI-3 - Tolérance orale

L'intestin est un organe connu pour son environnement pro-tolérologène, en particulier envers les antigènes alimentaires et les bactéries commensales. Des approches mettant à profit cette caractéristique dans le but d'induire une tolérance spécifique au FVIII thérapeutique ont été développées. L'étude princeps, consistait en l'administration nasale et orale du domaine C2 du FVIII dans les muqueuses nasales et digestives de souris hémophiles A. Cette administration réduisait le risque de développer des inhibiteurs anti-C2 chez les souris traitées. De plus, la tolérance acquise était transférable à des souris hémophiles A naïves après le transfert adoptif de splénocytes CD4⁺ (Rawle et al. 2006). Toutefois, pour être pleinement efficace, cette approche requière la protection de l'antigène contre la dégradation par les sucs gastriques. La production de substances bioactives par les plantes, protégeant de leur paroi cellulaire la substance active, a permis l'avancement de ce genre de thérapie (Top et al. 2019). Ainsi, des épitopes du FVIII ou même le FVIII entier, ont pu être produits par des plants de tabac ou de laitue transgéniques. Les souris hémophiles A nourries par ces plantes contenant les antigènes du FVIII, développaient moins d'inhibiteurs que les souris hémophiles A contrôles. De plus, l'ingestion des antigènes éliminait l'immunité anti-FVIII préexistante, avec une réduction du titre inhibiteur au cours du temps, suggérant le développement de Tregs (Kwon et al. 2018; Sherman et al. 2014). Cette approche présente l'avantage de ne pas immuno-déprimer les patients et la production de FVIII par les plantes se fait à faible coût.

VI-4 - Thérapie génique

En plus d'être l'organe majoritaire produisant le FVIII, le foie est un organe connu pour son environnement pro-tolérologène. En effet, il est en contact constant avec les antigènes provenant de l'intestin et en produit énormément lui-même. Des mécanismes permettant

d'éviter le développement de réactions immunitaires démesurées ont donc été développés (Tiegs & Lohse 2010). La découverte des LSEC comme cellules productrices majoritaires de FVIII dans le foie, ainsi que leur rôle dans la modulation des réponses immunitaires T, et la promotion d'induction de Tregs, font d'elles une cible intéressante pour la thérapie génique (Carambia & Herkel 2014; Everett et al. 2014; Fahs et al. 2014; Knolle & Wohlleber 2016; Zanolini et al. 2015). En adressant l'expression du FVIII dans le foie, à l'aide de vecteurs viraux contenant le gène *F8* sous le contrôle de promoteurs spécifiques du foie, soit par les hépatocytes, soit par les LSEC des équipes de recherches ont démontré qu'en plus de corriger les saignements, une tolérance spécifique au FVIII, se traduisant par une chute du nombre d'inhibiteurs, est mise en place chez des chiens et souris hémophiles A (Finn et al. 2010; Merlin et al. 2017, 2019; Sabatino et al. 2011). D'autre part, chez la souris hémophile A, les inhibiteurs préalablement formés sont éliminés après la transduction des LSEC par des AAV par un mécanisme impliquant les Tregs (Merlin et al. 2017, 2019). L'intensité de la tolérance est par ailleurs dépendante du niveau d'expression du transgène (Lytle et al. 2016). Cependant, une expression trop élevée de FVIII par les hépatocytes provoque un stress du réticulum endoplasmique, conduisant à la malformation des protéines (Lange et al. 2016; Zolotukhin et al. 2016).

Enfin, la période néo-natale étant connue pour être pro-tolérologène, et les patients hémophiles A n'ayant dans une large majorité pas été traités quelques jours après la naissance, une équipe de recherche a tenté d'induire une tolérance en administrant des AAV codant le FVIII chez des souris hémophiles A nouveau-nés. Une expression du FVIII, sans induction d'inhibiteurs, était notée mais due à la nature non intégrative des AAV, l'expression du transgène était réduite un an et demi après le traitement (Hu & Lipshutz 2012). De plus, ces résultats ne sont pas transposables à l'Homme car les différences d'état de maturation des systèmes immunitaires humain et murin à la naissance font qu'une tolérance néonatale peut-être induite chez la souris mais pas chez l'Homme.

VI-5 - Thérapie cellulaire T

La réponse immunitaire anti-FVIII étant dépendante des LT, et la présence de Tregs inhibant le développement d'inhibiteurs, une stratégie destinée à induire la génération de Tregs spécifiques du FVIII est nécessaire. Le développement récent de récepteurs antigéniques chimériques (CAR), et de récepteurs B à anticorps (BAR), a permis d'atteindre

cet objectif, au moins chez la souris et *in vitro* chez l'Homme. Des Tregs humaines transduites à l'aide de vecteur rétroviraux codant un CAR exposant le domaine A2 du FVIII, prolifèrent en présence de FVIII et inhibent la prolifération des LT effecteurs humains spécifiques du FVIII *in vitro*. L'administration de ces CAR à des souris hémophiles A ayant développé une réponse immunitaire, permettait la suppression du développement d'anticorps anti-FVIII. Cette tolérance n'était cependant pas durable dans le temps. En effet, 8 semaines après le traitement, le challenge des souris avec du FVIII conduisait au développement d'une réponse immunitaire (Yoon et al. 2017). Avec le même objectif, des Tregs humaines ont été transduites avec un BAR arborant les domaines A2 ou C2 du FVIII. Cette fois, seules la différenciation et la prolifération des LB spécifiques du FVIII sont inhibées sans affecter les LT spécifiques du FVIII, bloquant ainsi la génération d'inhibiteurs *in vivo* (Zhang et al. 2018). C'est en ciblant les LB mémoires spécifiques du FVIII que les BAR parviennent à supprimer la réponse anti-FVIII et ainsi instaurer une tolérance chez la souris hémophile A (Pohl et al. 2020).

La technologie des BAR a également été utilisée pour générer des LT cytotoxiques exposant les domaines A2 et C2 du FVIII, permettant ainsi de cibler les LB spécifiques du FVIII. Tandis que l'utilisation d'un des domaines/BAR permet une réduction partielle du nombre de cellules sécrétrices d'anticorps spécifiques du FVIII, l'administration simultanée des deux BAR permet une éradication quasi-totale de ces cellules *in vitro*. L'administration des A2 et C2 BAR à des souris hémophiles A a, de plus, permis de prévenir l'apparition d'anticorps anti-FVIII après leur immunisation avec du FVIII thérapeutique. L'absence de LB mémoires spécifiques du FVIII dans la rate des souris traitées, et la protection durable établie, suggère que le mécanisme d'action des BAR passe par l'élimination des précurseurs mémoires spécifiques du FVIII (Parvathaneni & Scott 2018).

Ces études pré-cliniques présentent des résultats encourageants quant à la possibilité d'éliminer les inhibiteurs de façon permanente.

VI-6 - FVIII-Fc

La fusion de fragment Fc à des antigènes modèles a été plusieurs fois démontrée comme pro-toléro-gène (Zambidis & Scott 1996). Cette tolérance est médiée au moins en partie à la fixation de la partie Fc aux récepteurs Fc, inhibant ainsi l'activation des LB (Bijsterbosch & Klaus 1985). De plus, les IgG1 humaines et murines sont la sous-classe d'IgGs la plus affine pour le récepteur inhibiteur FcγRIIb exprimé par exemple par les LB (Bruhns et

al. 2009). L'administration répétée de FVIII-Fc chez des souris hémophiles A induit une réponse immunitaire beaucoup moins importante que l'administration de FVIII entier ou BDD (Krishnamoorthy et al. 2016). Le contrôle de cette réponse est médié par l'induction de cellules T regs et une diminution des cellules T effectrices spléniques. Par ailleurs la fixation du FVIII-Fc aux FcγRs ou au FcRn est indispensable pour induire la tolérance démontrant l'importance du fragment Fc (Krishnamoorthy et al. 2016).

L'utilisation du FVIII-Fc sur des petites cohortes de patients hémophiles A sévères ayant failli à l'ITI, a permis d'instaurer une tolérance, même à des doses plus faibles que celles administrées avec un FVIII standard. Après le traitement, les patients présentaient tous une absence d'inhibiteurs, et l'activité du FVIII était restaurée chez deux patients sur trois (Abraham et al. 2018; Groomes et al. 2016; Malec et al. 2016).

Au cours d'une deuxième étude pré-clinique, l'équipe de Lillicrap a tenté de déterminer l'un des mécanismes d'action du FVIII-Fc dans l'induction de tolérance. A l'aide de souris hémophiles A, et d'une lignée cellulaire B spécifique du FVIII, son groupe a démontré que le co-engagement du BCR spécifique du FVIII et du FcγRIIB par le FVIII-Fc induisait le déclenchement de signaux inhibiteurs de la signalisation du BCR au sein des LB ; inhibant ainsi leur activation (Georgescu et al. 2020).

Malgré les résultats encourageants au sein des modèles pré-cliniques, les études rétrospectives et les études sur des petites cohortes de patients, les résultats des essais cliniques préliminaires sont décevants. En effet, environ 31% patients traités avec du FVIII-Fc développent des inhibiteurs, soit autant que lors d'un traitement avec un produit standard (Königs et al. 2022)

VI-7 - Passage transplacentaire

Le développement d'inhibiteurs se produisant une quinzaine de jours après le premier traitement des saignements, mon laboratoire a décidé de cibler une fenêtre avant la première exposition au FVIII pour induire la tolérance. En effet, c'est lors de la grossesse que le système immunitaire du fœtus est éduqué et que s'instaure la tolérance aux antigènes du soi. Plus précisément, la mise en place et l'éducation du système immunitaire à lieu au 13,5^{ème} jour de gestation chez la souris, et entre la 6^{ème} et 10^{ème} semaine de grossesse chez l'humain (Mimoun et al. 2020). Notre approche consistait en l'injection de molécules de fusion comprenant les domaines immuno-dominants du FVIII A2 et C2, et le fragment Fc d'une IgG1 murine à des

souris hémophiles A gestantes. Après leur passage à travers le placenta, le A2-Fc et le C2-Fc étaient capturés par des cellules dendritiques migratoires SIRP α^+ du fœtus et atteignaient le thymus où ils induisaient des Tregs spécifiques du FVIII. Bien que la réponse immunitaire suivant l'injection répétée de FVIII thérapeutique au sein de la descendance de mères traitées avec du A2-Fc et C2-Fc était fortement réduite par rapport à la descendance d'une mère contrôle, elle était pourtant incomplète (Gupta et al. 2015). L'idée de mon projet de thèse émergea de ces travaux.

VII - Transfert materno-fœtal d'immunité

VII-1 - Formation du placenta

Les circulations fœtale et maternelle sont séparées par différentes barrières cellulaires du placenta. Cet organe d'origine fœtale, est le premier à se former lors du développement. Il lie biologiquement et physiquement l'embryon à l'utérus permettant le bon déroulement de la grossesse. Jouant à la fois le rôle de connecteur et de barrière entre le fœtus et la mère, il excrète les déchets fœtaux (urée, dioxyde de carbone...) vers la circulation maternelle et fournit l'ensemble des nutriments, eau et oxygène nécessaires à la croissance du fœtus. En effet, l'embryogénèse ne progresse qu'en présence d'un placenta fonctionnel (Brosens et al. 2011). Bien que cet organe soit conservé au sein de nombreuses espèces, il présente une haute variabilité de forme, taille et nombre de couches cellulaires séparant la circulation fœtale de la circulation maternelle (Schmidt et al. 2015).

VII-1.A - Formation du placenta chez l'Homme

Chez l'Homme, l'organisation du placenta est dite hémomonochoriale : les villosités placentaires sont en contact direct avec les vaisseaux sanguins maternels, seulement séparés par une couche syncytiale. Une dizaine de jours après la fertilisation de l'ovocyte, le blastocyste s'implante et fusionne partiellement avec l'endomètre. Suivant l'implantation de l'embryon, le trophoblaste, qui est le premier épithélium à se former pendant l'embryogénèse (Wiley 1988), prolifère pour former l'unique type cellulaire composant le placenta humain : le trophoblaste du blastocyste (Turco et al. 2019). Lors de la seconde semaine de grossesse, le decidua entourant le blastocyste est digéré enzymatiquement et les espaces en résultant sont envahis par les cellules mononucléaires du cytotrophoblaste marquant le début de la formation des villosités primaires du placenta (Hertig et al. 1956; James et al. 2012; Knöfler et al. 2019).

Le cytotrophoblaste, qui constitue la couche interne du trophoblaste, est composé de cellules prolifératives de type cellules souches. Au cours de la seconde semaine de gestation, les cellules du cytotrophoblaste engendrent l'ensemble des sous types cellulaires du trophoblaste soit : le trophoblaste villositaire, les trophoblastes chorioniques et extravillous et les villosités choriales (Horii et al. 2018). Les villosités choriales sont constituées des vaisseaux sanguins fœtaux, de cellules mésenchymateuses, de macrophages fœtaux : les cellules de Hofbauer ; et sont entourées du cytotrophoblaste et du syncytiotrophoblaste.

Bien que la structure finale du placenta soit achevée à la quatrième semaine de grossesse (Benirschke & Kaufmann 1990; James et al. 2012; Knöfler et al. 2019), l'approvisionnement en sang maternel n'a lieu qu'à partir de la dixième semaine de gestation (Burton et al. 1999, 2002). L'organisation en villosité du système vasculaire fœtal ainsi que sa disposition « à contre-courant » du système sanguin maternel maximise l'assimilation des nutriments (Adamson et al. 2002). Le syncytiotrophoblaste se comporte comme une couche de cellules endothéliales et recouvre l'ensemble de la plaque et des villosités chorioniques interagissant ainsi directement avec le sang maternel. Elles agissent comme une barrière contre les toxines, les pathogènes mais également contre les cellules maternelles tout en étant perméables à l'oxygène, aux nutriments et immunoglobulines maternelles. Les IgG maternelles doivent donc traverser deux couches cellulaires et le stroma afin d'atteindre les vaisseaux sanguins du fœtus (Wang 2010).

Tout au long de la grossesse, la surface d'interaction entre le fœtus et sa mère croît grâce aux processus combinés d'angiogenèse des vaisseaux fœtaux, et de la prolifération et différenciation continues du trophoblaste. À terme, le syncytiotrophoblaste atteint jusqu'à 12 m² représentant 80% de la surface du placenta tandis que le cytotrophoblaste, lui, devient discontinu (Aplin et al. 2020). Ceci a pour conséquence de réduire la distance séparant les circulations fœtale et maternelle ce qui est adapté aux besoins croissants du fœtus en fin de gestation (Ellery et al. 2009; Horii et al. 2018) (Figure 7).

VII-1.B - Formation du placenta chez la souris

Le choix de la souris comme modèle animal se justifie par bien des points ; la souris étant un animal de petite taille, ayant un cycle de reproduction court et des portées pouvant atteindre jusqu'à 10 bébés. Cependant il est important d'avoir pleine conscience des différences existant entre l'Homme et la souris si nous souhaitons transférer des résultats obtenus chez l'animal à la clinique. Bien que comme l'Homme, la souris dispose d'un placenta hémochorial, son placenta présente des différences anatomique, structurale et fonctionnelle avec le placenta humain (Rossant & Cross 2001). Cependant, le choix d'un autre modèle animal n'aurait pas été relevant, la placentation humaine étant plus proche de celle des souris que de celle d'autres mammifères de plus grande taille (Hemberger et al. 2020).

Le placenta chorio-allantoïque murin est constitué de trois couches de cellules, il est dit hémotrichorial. En plus du placenta chorio-allantoïque, les souris disposent d'un sac vitellin qui est actif du début à la fin de la gestation (Beckman et al. 1990). Le transport de

molécules thérapeutiques pourrait être différent entre la souris et l'Homme en raison de la présence de ce sac vitellin. Le développement fœtal murin est proche de celui de l'Homme. Brièvement, il débute par la fertilisation d'un ovocyte par un spermatozoïde au jour 0,5 de gestation (E0,5). À partir de E3,5-4,5, les types cellulaires définitifs émergent avec la formation du trophoctoderme et de la masse cellulaire interne ; qui elle-même se différencie ensuite en épiblaste et endoderme. De ces deux types cellulaires naissent l'embryon et le sac vitellin. Une fois l'embryon formé, il s'implante dans la paroi utérine et l'établissement d'un dialogue continu entre les cellules du trophoblaste et les cellules du decidua maternel permet la progression du développement embryonnaire. Suivant l'implantation du fœtus à E6,5, l'allantoïde, une membrane recouvrant l'embryon des vertébrés et participant aux échanges gazeux, est formée à partir de l'épiblaste. Dans un même temps, le mésoderme extra-embryonnaire se forme et donne naissance à l'amnios qui contient le liquide amniotique, et au chorion qui permet les échanges nutritionnels entre la mère et le fœtus. De la fusion des membranes de l'allantoïde et du chorion émerge finalement un placenta précoce à E8,5. Cette fusion est suivie par l'invagination des vaisseaux sanguins fœtaux de E10 à 14,5, formant ainsi le labyrinthe placentaire. Cette structure fortement intriquée et dentelée et sa juxtaposition avec les vaisseaux sanguins maternels favorise les échanges nutritifs et gazeux avec la circulation maternelle. Cette structure est absente au sein du placenta humain, dont la surface d'échange est constituée de cellules du trophoblastes. La persistance des progéniteurs cellulaires multipotents jusqu'en milieu de gestation aide à l'expansion des vaisseaux sanguins fœtaux et à la différenciation des cellules du trophoblastes en syncytiotrophoblastes. Tout comme chez l'Homme, les cellules du syncytiotrophoblaste forment un site majeur d'échange entre la mère et l'enfant (Hemberger et al. 2020) (Figure 7).

L'ensemble des différences entre le placenta humain et murin nous démontre que le transfert transplacentaire de molécules thérapeutiques chez l'Homme ne peut être parfaitement mimé à partir d'un modèle murin. En effet, les molécules doivent traverser le sac vitellin qui est absent chez l'Homme. Par ailleurs, il a été démontré que des molécules comme le plutonium peuvent être piégées dans le sac vitellin (Kubota et al. 1993). Enfin, le transfert d'IgG chez les rongeurs se fait principalement par la lactation.

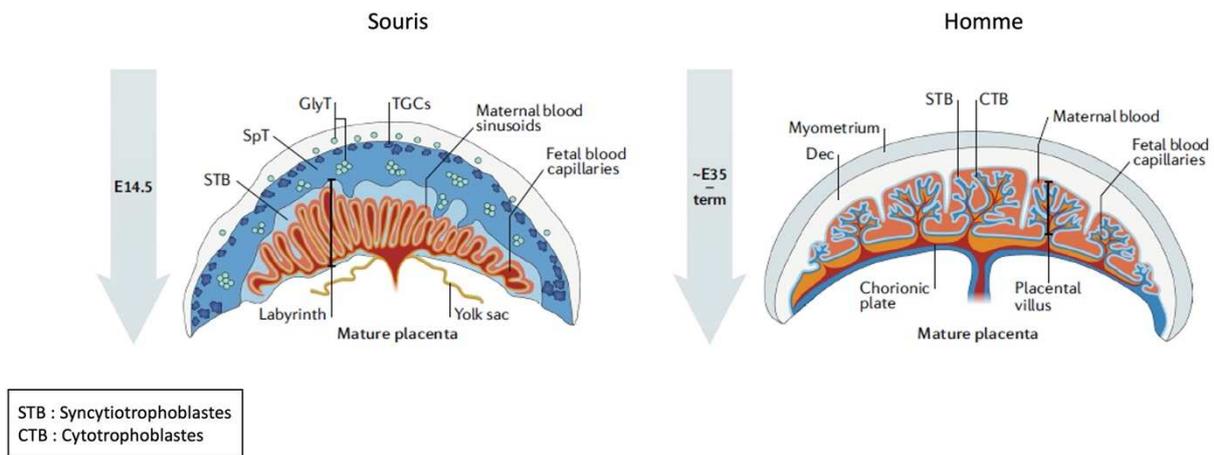


Figure 7 **Anatomies des placentas humains et murins.** Le placenta humain hëmo-monochorial est formé de cellules du cytotrophoblaste d'où émerge les cellules du syncytiotrophoblaste. L'architecture finale du placenta humain, est obtenue après 35 jours de grossesse mais l'apport en sang maternel n'a lieu qu'à partie de la 10^{ème} semaine de gestation. Les cellules du syncytiotrophoblaste, en contact direct avec le sang maternel, jouent le rôle de barrière contre les toxines et les pathogènes mais elles sont perméables aux IgGs maternelles. Le placenta murin hëmo-trichorial est constitué de trois couches cellulaires et est mature a E14.5. Tout comme chez l'Homme, les syncytiotrophoblastes forment le site majeur d'échanges entre la mère et l'enfant (Hemberger, Hanna and Dean, 2020)

VII-2 - Transfert transplacentaire des IgG maternelles

Le transfert transplacentaire et transépithélial des IgGs maternelles est un mécanisme essentiel à la protection du fœtus et du nouveau-né, fournissant à l'enfant une immunité passive contre un large spectre de pathogènes. Le concept d'un transfert passif d'immunité de la mère à l'enfant fut d'abord documenté il y a plus d'un siècle par Paul Ehrlich puis, par Brambell.

VII-2.A - Transcytose des IgGs maternelles chez l'Homme

Bien que les IgGs maternelles soient détectées dans le sang de cordon ombilical dès la 8^{ème} semaine de gestation (Simister 2003), le transfert ne débute réellement qu'à partir de la seconde moitié du second trimestre de gestation (Gitlin & Boesman 1966). En effet, seules 10% des IgGs maternelles sont transférées de la 17^{ème} à la 20^{ème} semaines de gestation, tandis que cette concentration croît exponentiellement pour atteindre 50% à la 30^{ème} semaine, est maximale en fin de grossesse, et qu'elle excède la concentration maternelle à terme (Kohler & Farr 1966; Longsworth et al. 1945; Malek et al. 1994, 1996). Le transfert plus marqué et important des IgGs maternelles en fin de grossesse, est confirmé par le fait que les enfants nés prématurément présentent une concentration d'immunoglobulines inférieure à celle retrouvée chez un enfant né à terme.

L'augmentation du passage au cours de la grossesse est lié à l'augmentation de la surface d'échange, qui passe de 5m² à la vingtième semaine de grossesse à 12m² à partir de la

semaine 28 jusqu'au terme (Ellery et al. 2009). En plus de l'âge gestationnel, le transfert des immunoglobulines maternelles dépend également du statut immunocompétent de la mère, des potentielles infections au cours de la grossesse, de l'intégrité du placenta... Paradoxalement, en cas d'hyperglobulinémie maternelle, le système de transfert d'IgG est saturé et le transfert d'immunité est réduit (Palmeira et al. 2012).

VII-2.B - Transcytose des IgGs maternelles chez les rongeurs

Chez les rongeurs, seule une faible partie de l'immunité est transmise par le passage au travers du sac vitellin. Cependant, une faible mais non négligeable transcytose d'IgGs maternelles est détectée à partir du quinzième jour de gestation (E15) (Appleby & Catty 1983), et est maximale à E17 (Halliday 1955a). La majorité des IgGs est transmise après la naissance via la lactation. Les IgGs contenues dans le colostrum, et plus généralement dans le lait maternel, traversent l'épithélium intestinal, qui est perméable aux IgGs une vingtaine de jours après la naissance (Appleby & Catty 1983; Halliday 1955b,a), pour rejoindre la circulation du nouveau-né (Jones & Waldmann 1972). Cinq jours après la naissance, les nouveau-nés allaités ont un titre d'IgGs égal à leur mère (Halliday 1955a). À l'époque des premières observations de transfert, le mécanisme impliqué dans la transcytose était inconnu, bien que l'implication d'un récepteur Fc ait été envisagée (Brambell 1966; Brambell et al. 1964).

VII-3 - Expression du FcRn

Le récepteur Fc néonatal (FcRn) fût pour la première fois isolé à partir de cellules épithéliales intestinales de rat (Rodewald 1973, 1976; Simister & Rees 1985), puis à partir du sac vitellin de rongeurs (Roberts et al. 1990), et enfin à partir de cellules du syncytiotrophoblaste de placenta humain (Leach et al. 1996; Story et al. 1994).

Comme dit précédemment, le transfert des IgGs chez les rongeurs se fait principalement après la naissance par lactation. Ceci concorde avec l'expression du FcRn, retrouvé principalement dans les cellules épithéliales du duodénum et jéjunum et ce jusqu'au sevrage des petits où son expression se trouve fortement réduite (Gill et al. 1999; Rodewald 1976, 1980; Simister & Rees 1985). Néanmoins, le FcRn est également exprimé par les cellules du sac vitellin durant la vie fœtale (Ahouse et al. 1993; Roberts et al. 1990). De manière anecdotique, en plus d'être exprimé par les cellules de l'intestin et du placenta, il fût détecté dans les cellules endothéliales de la peau, de la rate, du foie et des muscles (Akilesh et al. 2007; Blumberg et al. 1995; Latvala et al. 2017; Li & Balthasar 2018).

À l'inverse, bien que l'expression de FcRn par les cellules intestinales persiste à l'âge adulte chez l'Homme, le transfert des IgGs maternelles se produit principalement *in utero* et le lait maternel ne contient que peu d'IgGs (Dickinson et al. 1999; Israel et al. 1997; Lewis-Jones et al. 1985). Cette différence d'expression entre FcRn humain et FcRn murin s'explique par les différences structurelles des promoteurs contrôlant l'expression du gène *FCGRT* codant le FcRn (Mikulska et al. 2000; Tiwari & Junghans 2005). Tout comme chez la souris, l'expression du FcRn humain ne se limite pas au placenta et intestin. Le récepteur est également retrouvé dans le foie, les reins, les poumons, le pancréas, le cœur, le cerveau et les glandes mammaires (Cianga et al. 1999; Kobayashi et al. 2002; Latvala et al. 2017; Story et al. 1994). En plus des cellules de type épithélial et syncytial, il est exprimé par les cellules hématopoïétiques à l'exception des LT et des Natural Killer (NK) (Montoyo et al. 2009; Vidarsson et al. 2006; Zhu et al. 2001). À l'état basal, il est principalement retrouvé dans des vésicules intracellulaires mais l'activation cellulaire peut influencer sa distribution au sein des cellules (Dickinson et al. 1999; Zhu et al. 2001).

VII-4 - Structure du FcRn

Le FcRn est une molécule hétérodimérique formée d'une chaîne légère bêta-2-microglobuline ($\beta 2m$) de 14000 Da, et d'une chaîne lourde de 50000 Da, hautement conservées au sein des espèces (Ahouse et al. 1993; Kandil et al. 1996; Mikulska et al. 2000). La chaîne lourde est constituée de 3 domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, d'une région transmembranaire en C-terminal du domaine $\alpha 3$, permettant l'ancrage du récepteur aux membranes, et d'un domaine cytoplasmique court (Martin et al. 2001). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont eux-mêmes composés d'un plancher de feuillets bêta antiparallèles, surplombé de deux hélices alpha (Burmeister et al. 1994a; Vaughn & Bjorkman 1998). En l'absence de la chaîne $\beta 2m$, le FcRn est mal conformé et non fonctionnel (Allen et al. 1986; Leach et al. 1996). L'organisation de la chaîne lourde en hélices alpha antiparallèles, la présence d'un domaine transmembranaire, et de la chaîne $\beta 2m$, ainsi que l'homologie des séquences codantes laissaient penser que ce récepteur était un homologue structurel du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type 1 (Burmeister et al. 1994a; Leach et al. 1996; Roberts et al. 1990; Simister & Mostov 1989). Cependant, malgré leur homologie de structure et de séquence, le gène *FCGRT* (présent au sein du chromosome 19q13 chez l'Homme et 7 chez la souris) est localisé de manière externe au complexe de gènes codant pour le CMH.

VII-5 - Interaction avec le FcRn

La fixation des IgGs contenues dans le lait maternel de pH 6-6,5 au FcRn exprimé par les cellules intestinales (Gregg & Weiner 1993), ainsi que leur fixation aux membranes du placenta à pH acide (Balfour & Jones 1977; Jones & Waldmann 1972; Rodewald & Kraehenbuhl 1984; Watabe et al. 1980) suggéraient une fixation dépendante du pH. Il fut d'abord pensé que le pH acide induisait un changement de conformation du récepteur permettant la fixation des IgGs (Raghavan et al. 1993). Finalement, il s'est avéré qu'en plus de stabiliser la structure du FcRn en favorisant l'interaction entre ses chaînes lourde et légère, le pH acide favorise l'interaction IgGs avec le FcRn par la protonation des trois histidines (His) 310, 435 et 436 pour la souris (Tyr436 chez l'Homme) qui sont exposées dans des boucles à l'interface des domaines CH2-CH3 de la chaîne lourde des IgGs (Martin et al. 2001; Raghavan et al. 1994, 1995; Vaughn & Bjorkman 1998). Ces histidines, ainsi que l'isoleucine 253, interviennent dans la fixation au FcRn (Challa et al. 2014; Kim et al. 1994a, 1999; Martin et al. 2001). Les domaines CH2 et CH3 des IgG, et plus précisément ces acides aminés, sont très conservés au sein des espèces ce qui démontre leur importance dans l'interaction IgG/FcRn (Kabat et al. 1992; Medesan et al. 1997). A pH<6, les H310,435 et 436 sont protonées ; elles forment des ponts salins avec les glutamines 117 et 132 et l'asparagine 137 présentes dans une poche anionique du domaine $\alpha 2$ de la chaîne lourde du FcRn (Burmeister et al. 1994a; Martin et al. 2001; Raghavan et al. 1994; Vaughn et al. 1997; Vaughn & Bjorkman 1998) et avec l'isoleucine 1 de la chaîne $\beta 2m$ (Shields et al. 2001). Une fois dans le sang fœtal de pH physiologique, les histidines se déprotonent et l'interaction IgG/FcRn est rompue.

Des études de cristallographie ont démontré que l'interaction IgG/ FcRn repose sur une stœchiométrie de 2:1 avec deux FcRn fixant chacun une chaîne lourde de l'IgG (Abdiche et al. 2015; Burmeister et al. 1994b; Huber et al. 1993; Martin & Bjorkman 1999; Martin et al. 2001; Vaughn et al. 1997). Il fût démontré plus tard que le FcRn avait un second ligand : l'albumine.

Les histidines 464, 510 et 535 ainsi que la glutamine 505 présentes dans les poches hydrophobes des domaines IIIa et IIIb de l'albumine interagissent avec la glutamine 54 et l'histidine 166 (His 168 chez la souris) du domaine $\alpha 2$ du FcRn (Andersen et al. 2006, 2010, 2012).

Bien que le FcRn puisse fixer simultanément une IgG et une albumine (Oganesyanyan et al. 2014; Schmidt et al. 2013), il a été démontré que le fragment fixant l'antigène (Fab) de l'IgG fixée au FcRn pourrait induire des chocs stériques avec la membrane cellulaire changeant l'orientation du FcRn vers une position moins favorable à la fixation de l'albumine. Il a été proposé que pour pallier les chocs stériques, les IgGs fixent le FcRn en conformation « T », ce qui est possible par la nature très flexible de leur partie Fab (Booth et al. 2018; Timofeev et al. 1978).

VII-6 - Transcytose et recyclage des IgGs et de l'albumine

VII-6.A - Mécanisme de transcytose

Dès les années 70, Brambell avait une idée du mécanisme impliqué dans le transfert des immunoglobulines de la mère à l'enfant. Selon son hypothèse, seules les IgGs sont internalisées par un processus non-spécifique de pinocytose par les cellules du syncytiotrophoblaste ou de l'intestin (Brambell et al. 1964). À la suite de leur internalisation, les immunoglobulines ont deux destins différents : elles sont soit dégradées par les enzymes lysosomales, soit protégées de la dégradation et sécrétées dans l'espace extracellulaire pour rejoindre les réseaux lymphatiques (Brambell 1969). C'est par la fixation à un récepteur spécifique du fragment cristallisable (Fc) des IgG, qu'elles atteignent la circulation fœtale (Brambell 1966; Brambell et al. 1964).

Ce n'est que des années plus tard que les mécanismes cellulaires impliqués dans la transcytose et le recyclage des IgGs et de l'albumine ont été découverts. Dû à leur faible affinité pour le FcRn à pH neutre, le transfert materno-fœtal d'IgGs débute par une internalisation non-spécifique « fluid phase » par les syncytiotrophoblastes ou les cellules épithéliales de l'intestin (Abrahamson & Rodewald 1981; Antohe et al. 2001; Ellinger et al. 1999). Suivant leur internalisation, les IgGs s'accumulent dans les endosomes précoces EEA1⁺, Rab4⁺, Rab5⁺, Rab11a⁺ où elles fixent le FcRn sous l'effet du pH acide (McCarthy et al. 2000). Les complexes migrent vers le pôle basal de la cellule au sein d'endosomes de recyclage qui fusionne complètement ou partiellement avec la membrane plasmique de la cellule et libère les complexes vers l'espace intercellulaire (Ober et al. 2004a; Ward et al. 2005). Une fois dans la circulation fœtale de pH neutre, les histidines des IgGs se déprotonent rompant ainsi la liaison entre le récepteur et son ligand bien que la rupture d'interaction ne soit pas immédiate

(Ober et al. 2004a; Rodewald 1980). Le récepteur, lui, retourne à sa position d'origine (Dickinson et al. 1999) (Figure 8).

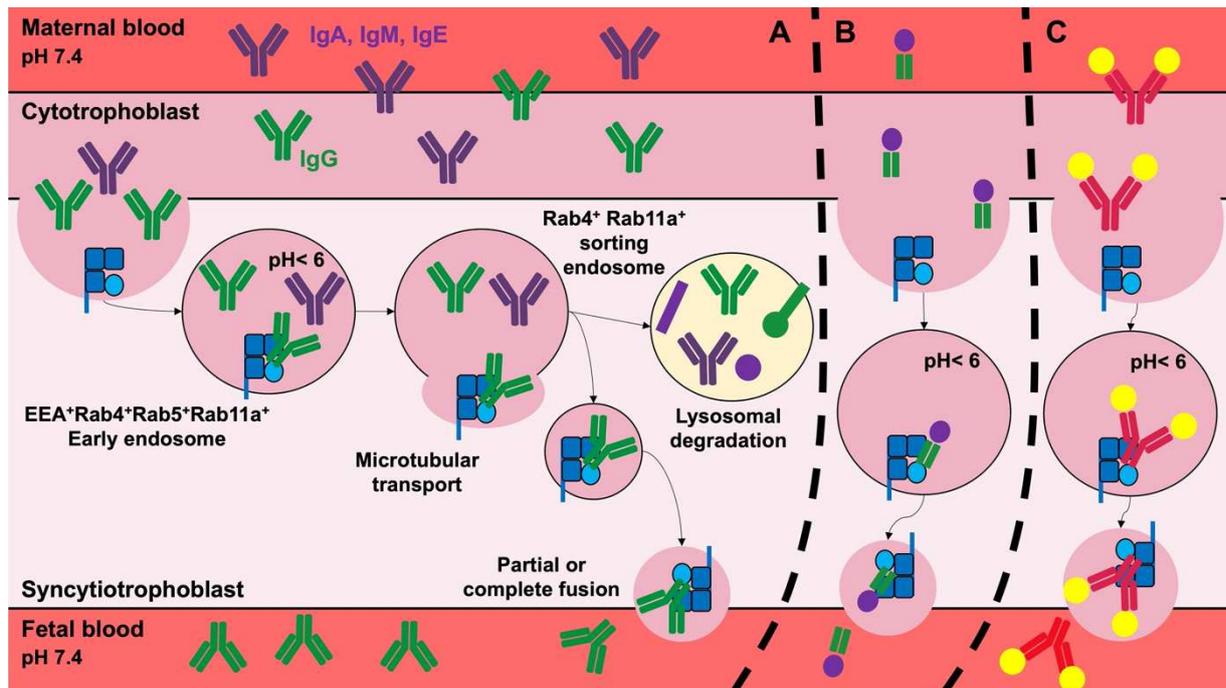


Figure 8 **Transfert transplacentaire d'IgGs maternelles et de molécules thérapeutiques.** (A) Le transfert transplacentaire des IgGs maternelles débute par leur internalisation non spécifique par les cellules du syncytiotrophoblastes. Les IgGs internalisées interagissent ensuite avec les FcRn dans les endosomes précoces de pH acide, les protégeant ainsi de la dégradation lysosomale. Les endosomes précoces mûrissent en endosome de recyclage, qui suivent un réseau de microtubules pour atteindre le pôle basal de la cellule. Une fois au pôle basal, la membrane endosomale fusionne entièrement ou partiellement à la membrane plasmique de la cellule et les IgGs sont libérées vers l'espace intercellulaire. (B) Le même mécanisme permet le transfert transplacentaire de molécules de fusion comme le FVIII-Fc ou la PPI-Fc (C) ou le transfert de complexes immuns (Mimoun et al., 2020)

VII-6.B - Mécanisme de recyclage

L'allongement de la demi-vie des IgGs et de l'albumine repose sur un système de recyclage. C'est par l'observation d'une demi-vie réduite des IgGs chez des souris déficientes pour la chaîne $\beta 2m$ (Ghetie et al. 1996; Israel et al. 1995, 1996; Junghans & Anderson 1996) ou pour le FcRn (Roopenian et al. 2003) que son implication fût envisagée. Tout comme pour la transcytose, le recyclage débute par une internalisation non-spécifique « fluid phase » de l'albumine ou des IgGs par les cellules endothéliales vasculaires et les macrophages (Akilesh et al. 2007; Borvak et al. 1998; Challa et al. 2019; Ward et al. 2003). Les vésicules tubulaires, résultant de l'invagination de la membrane plasmique lors du processus d'internalisation, fusionnent ensuite avec les endosomes précoces où les IgG accumulées se fixent au FcRn à pH acide (Kim et al. 1994b, a,c; Ober et al. 2004a,b; Prabhat et al. 2007; Spiegelberg & Weigle 1965). Les endosomes précoces mûrissent en endosomes de recyclage Rab4⁺, Rab11a⁺ et suivent un réseau de microtubules afin de transporter les complexes FcRn/ IgGs vers le pôle

basal de la cellule (McCarthy et al. 2000). C'est par la fixation des IgGs ou de l'albumine au FcRn que ces dernières sont protégées de la dégradation lysosomale en les remettant en circulation (Antohe et al. 2001; McCarthy et al. 2000; Ober et al. 2004b; Ward et al. 2005).

Ce système est saturable, l'ensemble des molécules n'ayant pas fixé le récepteur se trouve déporté vers les lysosomes pour y être dégradées (Junghans & Anderson 1996; Ober et al. 2004b; Ward et al. 2003). À l'inverse des IgGs monomériques, même ayant fixé leur antigène cible, les complexes immuns (CI) multimériques ont une très faible demi-vie en circulation due à la fixation croisée à plusieurs FcRn et leur déportation vers les lysosomes (Weflen et al. 2013). Cette voie de tri des CI conduit à la destruction de pathogènes opsonisés prévenant ainsi leur transcytose à travers les épithéliums.

VII-6.C - Facteurs modulant le transfert transplacentaire et le recyclage

L'étude de la fixation du FcRn a démontré une forte spécificité pour les IgGs. Chez l'Homme, les IgA, IgM, IgD et IgE sont peu transférées à travers le placenta; et bien que le lait maternel soit riche en IgA, elles ne sont que peu transmises à travers la barrière intestinale chez les rongeurs (Appleby & Catty 1983; Balfour & Jones 1977; Brambell 1969; Jones & Waldmann 1972; Malek et al. 1996) .

Des expériences de mutagenèse dirigée ont démontré l'importance des H310,435 et 436 des IgGs pour la fixation au FcRn (Deisenhofer 1981; Firan et al. 2001; Kim et al. 1994b; Medesan et al. 1996, 1997). Les variations de séquences au sein des domaines CH2-CH3 entre les différentes sous classes d'IgGs expliquent leurs différentes affinités pour le FcRn ainsi que leur transfert plus ou moins efficace de la mère à l'enfant (Vidarsson et al. 2014). Les IgG1 et IgG4 sont les sous-classes les plus transférées et qui persistent le plus en circulation tandis que l'allotype d'IgG3 qui présente une arginine en position 435 plutôt qu'une histidine, est transférée moins efficacement et a une demi-vie trois fois plus courte que celle des autres sous-classes d'IgGs. Son désavantage structurel la défavorise dans la compétition entre les sous classes d'IgG pour la fixation au FcRn (Kim et al. 1999; Malek 2003; Mathiesen et al. 2013; Stapleton et al. 2011, 2018; Vidarsson et al. 2014). Cette différence d'affinité se reflète alors sur le transfert d'immunité de la mère à l'enfant où dès les premiers instants la concentration en IgG1 au sein de la circulation fœtale est la plus élevée, augmentant exponentiellement tout au long de la grossesse jusqu'à excéder la concentration maternelle. Ce n'est qu'au troisième trimestre que les IgG4 et IgG3 sont transférées pour atteindre une concentration comparable à la circulation maternelle mais la concentration en IgG2 elle, reste inchangée (Malek et al.

1994, 1996). Récemment, ce dogme fut contredit par une étude démontrant que la hiérarchie du transfert des IgGs ne serait pas IgG1> IgG4> IgG3> IgG2 mais plutôt IgG1> IgG3 > IgG4 = IgG2 (Clements et al. 2020).

La nature du fragment Fc n'est pas la seule à influencer la fixation des Ig au FcRn. En effet, l'affinité d'une IgG dépend également de la nature de ses régions déterminant la complémentarité (CDR) et plus généralement à son Fab. Cet effet peut être attribué aux interactions électrostatiques dans les régions CDR riches en acides aminés chargés positivement, qui peuvent ralentir la dissociation des complexes IgG/FcRn à pH neutre (Piche-Nicholas et al. 2018; Rossini et al. 2020; Schlothauer et al. 2013; Schoch et al. 2015; Suzuki et al. 2010; Wang et al. 2011a). Le profil de glycosylation des IgGs a également un impact sur l'efficacité de transfert IgGs maternelles vers la circulation fœtale en modifiant leur affinité pour le FcRn (Jansen et al. 2016; Jennewein et al. 2019; Martinez et al. 2019).

Les gènes codant le FcRn humain et murin présentant une forte homologie de séquence et de structure. La validation molécules thérapeutiques pour l'Homme nécessitant l'expérimentation animale, des études de spécificité de fixation inter-espèces ont été menées. Le FcRn humain s'avère être très sélectif : il n'interagit que très peu avec les IgGs de souris, ce qui explique la faible demi-vie des premières IgGs thérapeutiques d'origine murine chez l'Homme. À l'inverse, le FcRn murin réagit avec une très forte affinité pour les IgGs bovines et de lapin et est même vingt fois plus affiné pour les IgGs humaines que le FcRn humain (Dumont et al. 2012; Ober et al. 2001). Cette disparité inter-espèce est également observée pour l'autre ligand connu du FcRn : l'albumine (Andersen et al. 2013).

VII-7 - Implication du FcRn dans la capture et la présentation d'antigènes

La présentation antigénique médiée par les Fc récepteurs participe aux processus physiologiques impliqués dans le maintien de la santé ou le développement de maladie. Le FcRn est exprimé par de nombreuses cellules immunitaires et par sa ressemblance structurale avec le CMH I, il fût d'abord associé à la présentation d'antigène. Cependant, des études cristallographiques ont démontré que le sillon accepteur de peptides du CMH n'était pas présent au sein de la molécule du FcRn (Burmeister et al. 1994b). Ce récepteur peut pourtant être indirectement impliqué dans l'internalisation et la présentation d'antigènes (Qiao et al. 2008). L'expression du FcRn par les neutrophiles a par exemple été associée avec la phagocytose de bactéries opsonisées par des IgG1 (Vidarsson et al. 2006). Le FcRn ne fixant

pas les IgGs à pH neutre, il fût proposé que des complexes immuns capturés et préalablement endocytés par des Fc récepteurs étaient fixés par le FcRn dans les compartiments endosomaux de pH acide. Ils seraient par la suite triés vers les compartiments de chargement de peptides antigéniques promouvant ainsi leur présentation par le CMH II ou présentation croisée par le CMH I (Baker et al. 2011, 2013b; Qiao et al. 2008). Enfin, la fixation des IgGs au FcRn favorise leur transcytose de la phase basolatérale de l'intestin vers la lumière intestinale où elles rencontrent et fixent leurs antigènes cibles. Les complexes immuns formés sont ensuite transportés à travers l'épithélium de la lamina propria où ils sont internalisés par des cellules présentatrices d'antigènes et présentés aux LT (Yoshida et al. 2004, 2006a,b).

Pour finir, il a récemment été découvert que le FcRn jouait un rôle majeur dans l'immuno-surveillance anti-tumorale. Son implication dans l'activation de cellules T CD8⁺ spécifiques d'antigènes tumoraux a été démontré dans le cancer colorectal. En effet, il permet l'induction de présentation croisée d'antigènes tumoraux par des cellules dendritiques aux LT CD8⁺ (Baker et al. 2013a). La déplétion du FcRn a également été associée avec une progression tumorale dans un modèle de métastases pulmonaires. En effet, les NK, qui jouent un rôle essentiel dans la protection antitumorale, présentent un phénotype immature avec des fonctions altérées en absence de FcRn. Cette absence de maturation n'est pas directement liée à l'absence d'expression du FcRn par les NK, ces derniers ne l'exprimant pas ; mais l'absence d'expression par d'autres types cellulaires comme les cellules dendritiques peut avoir un impact. En effet il a été décrit que les cellules dendritiques exprimant le FcRn sont importantes pour la formation des réponses LT CD8⁺ et que les cellules dendritiques interagissent avec les NK pour leur propre maturation (Castaneda et al. 2018).

VII-8 - Effets bénéfiques du transfert transplacentaire d'IgGs maternelles

Le transfert transépithélial ou transplacentaire d'anticorps maternels joue un rôle essentiel dans la protection du fœtus et du nouveau-né lui conférant une immunité passive contre de nombreux pathogènes. En effet, malgré l'explosion de production d'Ig pendant la vie fœtale, le nouveau-né n'a qu'une faible quantité d'Ig en circulation (Pastorelli et al. 1990). Le transfert d'immunité passive fût pour la première fois observé lors d'une épidémie de rougeole au 19^{ème} siècle où les enfants d'une mère ayant survécu se trouvaient protégés. Ce fût ensuite Paul Ehrlich qui en 1892 décrivit ce phénomène en observant que des bébés étaient protégés contre des toxines seulement si leurs mères étaient elles-mêmes résistantes.

Certaines infections sont plus sévères pendant la grossesse. Une bonne façon de protéger à la fois la mère et l'enfant est la vaccination. Actuellement, des campagnes de vaccination des femmes enceintes ont lieu dans le but de développer une immunité protectrice transférable au fœtus. Cette campagne de vaccination comprend des vaccins contre la grippe, la diphtérie, la coqueluche, la rougeole, la pneumonie, le méningocoque et l'hépatite (Benowitz et al. 2010; Englund et al. 1995; Forsyth et al. 2015; Nicoara et al. 1999; Tapia et al. 2016; van den Berg et al. 2011; Van Savage et al. 1990). Récemment, il fût démontré que l'injection du vaccin à ARN messager codant la protéine S du SARS Cov 2 chez des femmes enceintes conduisait au transfert d'IgGs dirigées contre la protéine S et contre le domaine de fixation au récepteur ACE2 (Rottenstreich et al. 2021).

Une administration de vaccin pendant le troisième trimestre de grossesse confère le plus haut taux d'anticorps spécifiques et, dans le cas de la coqueluche par exemple, cela protège le nouveau-né de l'infection jusqu'aux six premiers mois de vie (Abu-Raya et al. 2020). L'efficacité et la durée de l'immunité dépend de la spécificité antigénique des IgGs mais également du niveau d'anticorps générés par l'immunisation (Fu et al. 2016; Nicoara et al. 1999; Palmeira et al. 2012; Van Savage et al. 1990). Cependant, plusieurs études ont démontré que ce transfert pouvait diminuer les réponses immunitaires de l'enfant aux vaccins contre la coqueluche, la rougeole et le tétanos avec en conséquence des niveaux plus faibles d'anticorps après immunisation (Gans et al. 2003; Nic Lochlainn et al. 2019; Siegrist 2003). Malgré ce désavantage, les bénéfices pour les nouveau-nés comprennent une réduction des hospitalisations et de décès.

VII-9 - Effets délétères du transfert transplacentaire d'IgGs maternelles

Par ailleurs, le transfert d'IgGs maternelles peut avoir des répercussions sur le fœtus causées par le transfert d'autoanticorps maternels. Dans de tels cas, le FcRn joue un double rôle en prolongeant la demi-vie des autoanticorps chez la mère et en favorisant leur transfert vers la circulation fœtale induisant le développement de pathologies. L'un des exemple que nous pouvons citer est le développement du syndrome de Sjögren associé au transfert d'autoanticorps maternels dirigés contre les protéines nucléaires Ro/SSA et La/SSB (Nardi et al. 2006). Ce syndrome affecte environ 1 adulte pour 10000 avec une grande majorité de femme (90%) (Grossman & Tagliavini 2015; Qin et al. 2015). Les femmes atteintes du syndrome de Sjögren peuvent être asymptomatiques ou porteuses de différentes maladies

auto-immunes tel que le lupus érythémateux disséminé (Brucato et al. 2011; Rivera et al. 2009).

Chez approximativement 2% des bébés de mères affectées par le syndrome de Sjören le transfert des autoanticorps conduit au développement de lupus érythémateux fœtal, d'irruptions cutanées, de dommages hépatiques ou neuropsychiatriques ou un bloc cardiaque congénital (BCC) (Diaz-Frias & Badri 2020; Morel et al. 2015). Dans le cas du BCC, les autoantigènes Ro/SSA et La/SSB se relocalisent à la surface de cardiomyocytes apoptotiques (Clancy et al. 2010; Miranda et al. 1998) ou réagissent avec les canaux calciques de type L en surface des cardiomyocytes (Salomonsson et al. 2005). Suite à la fixation des anticorps à leurs cibles, le dépôt des CI provoque une inflammation des tissus, la rupture de l'homéostasie calcique et une calcification, ainsi qu'une fibrose cardiaque (Buyon & Clancy 2003; Llanos et al. 2012).

La maladie hémolytique du nouveau-né est un deuxième exemple de l'implication du transfert d'anticorps maternels dans le développement de pathologies fœtales (Das 2019). La prévalence de cette maladie causée par des anticorps ayant une spécificité autre que rhésus (Rh) D, est de 1 grossesse sur 500. Les anticorps maternels, auto-réactifs ou qui ont été développés au cours d'une précédente grossesse, ciblent les antigènes Rhésus (RhD, RhC, RhE...) exprimés par les cellules érythroïdes fœtales conduisant à leur destruction. La destruction des érythrocytes cause des anémies qui dans le pire des cas provoquent le développement de morbidité voire le décès (Moise 2008a,b).

Dans le dernier exemple, le transfert d'IgGs auto-réactives dirigées contre les glycoprotéines de surface des plaquettes induisent le développement de la thrombocytopénie auto-immune. Cette pathologie, qui touche 1 naissance sur 500, est caractérisée par un nombre réduit de plaquettes (Swinkels et al. 2018). Dans une variante de cette maladie, 1 mère sur 2000 développe des allo-anticorps dirigés contre les antigènes plaquettaires paternels. Le transfert de ces auto ou allo-anticorps provoque le développement de saignements spontanés dans les muqueuses et dans 1 et 20% des cas respectivement, le développement d'hémorragies intra-crâniennes (Burrows & Kelton 1993; Bussel et al. 2005).

L'implication du transfert d'IgGs auto-réactives maternelles dans le développement de pathologies chez le fœtus a été démontré dans de nombreuses autres maladies telles la maladie de Graves (Huel et al. 2009), la myasthénie auto-immune (Gilhus 2020; Hoff et al. 2006; McGrogan et al. 2010),...

De façon plus anecdotique, le transfert d'IgGs maternelles ciblant les neurones et les protéines gliales a aussi été associé au développement de maladies de spectre autistique (Abou-Donia et al. 2019) et le transfert d'IgEs maternelles sous forme de complexes IgE/ IgG anti-IgE promeut le développement d'allergies chez la souris (Bundhoo et al. 2015; Pavaglio et al. 2012).

VII-10 - Détournement des voies de recyclage et transcytose à visée thérapeutique

VII-10.A - Molécules thérapeutiques à demi-vie prolongée

Les petits peptides ou protéines sont des molécules intéressantes à utiliser en thérapie à cause de leur implication dans de nombreux processus biologiques. Cependant, leur potentielle utilisation en clinique se trouve limitée par leur courte demi-vie en circulation causée par leur catabolisme ou leur élimination par les reins (Sato et al. 2006). De nombreuses molécules thérapeutiques nécessitent donc d'être administrées de façon répétée afin de maintenir leur concentration en circulation au cours du temps (Strohl 2015). La capacité du FcRn à prolonger la demi-vie des IgGs et de l'albumine a été exploitée pour remédier à la rapide élimination des molécules thérapeutiques. Pour cela, la partie C-terminale de protéines d'intérêt se trouvent fusionnées à la partie N-terminale de Fc d'IgGs, de l'albumine ou d'un domaine fixant l'albumine. Ces molécules combinent le bénéfice pharmacologique de la molécule d'intérêt, et la demi-vie allongée des IgGs ou de l'albumine.

Parmi les molécules thérapeutiques utilisées, émergent quatre grands groupes de protéines : des peptides actifs (Cavaco et al. 2018), des enzymes ou cofacteurs (Dumont et al. 2012), des structures composées des domaines de fixation de multiples récepteurs agissant comme piège à cytokine (de Oliveira Dias et al. 2016) ou encore des domaines extracellulaire de récepteur (Larsen et al. 2005). En effet, la première molécule de fusion Fc à être développée, en 1984, était constituée du domaine extracellulaire du CD4 conjugué au fragment Fc d'une IgG1 (Capon et al. 1989). De nos jours, de nombreuses molécules ont été acceptées pour l'utilisation en thérapie, comprenant des traitements contre l'arthrite rhumatoïde (Lundquist 2007), le purpura thrombopénique immunologique, l'asthme, le psoriasis, ... (Rath et al. 2015).

La technologie des protéines fusionnées au Fc a été en particulier utilisée dans le domaine de l'hémophilie. La fusion d'un Fc au facteur de coagulation XI et au facteur pro-

coagulant VIII a permis d'augmenter leurs demi-vies réduisant ainsi le nombre d'injections nécessaires chez les patients (Dumont et al. 2012; Peters et al. 2010). Des stratégies impliquant l'albumine ont également été développées pour des traitements contre l'hémophilie B (Santagostino et al. 2016), le diabète (Duttaroy et al. 2005; Home & Kurtzhals 2006), le cancer (Andersen et al. 2010; Roovers et al. 2007) ou la polyarthrite rhumatoïde (Van Roy et al. 2015). Afin de prolonger encore la demi-vie des molécules de fusion, des mutations visant à augmenter l'affinité des fragments Fc pour le FcRn à pH acide (type M252Y/S254T/T256E YTE, M428L/N434S, ou M252Y/T256D YD; T256D/T307Q DQ; T256D/T307W DW) ont été introduites respectivement dans les domaines CH2 et CH3 du fragment Fc (Acqua et al. 2002; Mackness et al. 2019; Zalevsky et al. 2010).

VII-10.B - Saturation de la voie de recyclage des IgGs

Le système de recyclage des IgGs est saturable. Cette propriété est exploitée comme stratégie d'élimination d'IgGs endogènes pathogènes. Actuellement, l'élimination d'anticorps auto réactifs repose sur la déplétion des lymphocytes B (Lee et al. 2021), l'échange plasmatique (Zanatta et al. 2019), l'immunoabsorption (Padmanabhan et al. 2019) ou encore l'injection de large quantité d'IgG polyvalentes à usage intraveineux (IVIg). Les quantités importantes d'IgGs injectées saturent le système de recyclage et entrent en compétition avec les IgGs endogènes du patient pour fixer le FcRn, qui sont, elles, détournées vers les lysosomes (Hansen & Balthasar 2002; Jin & Balthasar 2005). Ces traitements sont lourds pour les patients, ils peuvent avoir des effets secondaires importants et sont coûteux pour le système de santé.

Un anticorps inhibiteur de FcRn dit Abdeg (pour « Antibodies that enhance IgG degradation ») a été généré pour avoir une meilleure affinité pour le FcRn à la fois à pH acide et à pH neutre qu'une IgG classique, qui elle sera dégradée dans les lysosomes. Actuellement cet anticorps, efgartigimod a passé la phase 3 d'essais cliniques (Ulrichs et al. 2018) (NCT04188379). D'autres anticorps inhibiteurs du FcRn ont passé ou sont en cours d'essais clinique de phase 2 et 3. Parmi eux : rozanolixizumab (Smith et al. 2018) (NCT04200456, NCT05063162, NCT04650854, NCT04875975), nipocalimab (ou M281) (Ling et al. 2019) (NCT04951622, NCT05327114, NCT04883619), orilanolimab (ou SYNT001) (Blumberg et al. 2019) (NCT04951622, NCT05327114, NCT04883619). Cette nouvelle approche thérapeutique se trouve être une alternative prometteuse pour le traitement de maladies auto-immunes

telles la thrombocytopénie auto-immune, la myasthénie auto-immune ou le lupus érythémateux disséminé (Bril et al. 2021; Robak et al. 2020).

VII-10.C - Élimination spécifique d'antigènes ciblés

Afin de neutraliser des petites molécules comme les toxines ou des molécules inflammatoires, des anticorps peuvent être utilisés. Ces anticorps vont au mieux fixer deux antigènes, ne formant pas de gros complexes immuns, ce qui peut conduire à des effets indésirables tels que le transport de l'antigène ou le prolongement de sa demi-vie (Finkelman et al. 1993; O'Hear & Foote 2005).

Pour pallier cet effet, des anticorps ont été générés pour favoriser l'élimination de molécules cibles. Les anticorps « acid-switch », ont la particularité de fixer avec une très haute affinité leur cible à pH neutre mais pas à pH acide. Après l'internalisation du complexe, l'anticorps se dissocie de son antigène dans l'endosome et pendant que l'IgG est recyclée, l'antigène est dirigé vers les lysosomes et dégradé (Chaparro-Riggers et al. 2012; Devanaboyina et al. 2013; Fukuzawa et al. 2017; Igawa et al. 2010; Yang et al. 2017).

Poursuivant le même objectif, une alternative exploitant la différence de concentration en calcium entre l'espace intercellulaire et les endosomes a été développée. Ces anticorps « calcium switch » ont été conçus pour fixer leur antigène sous une haute concentration en calcium telle celle retrouvée dans l'espace intercellulaire, et de rompre cette interaction à une concentration en calcium plus faible comme dans les lysosomes (Hironiwa et al. 2016). L'ensemble de ces approches a été utilisé dans le cadre de l'hypercholestérolémie (Chaparro-Riggers et al. 2012) ou de traitement des syndromes hémolytiques urémiques (Fukuzawa et al. 2017).

VII-10.D - Modelage du système immunitaire fœtale

La capacité des IgGs à traverser la barrière placentaire pendant la vie fœtale et la barrière intestinale pendant l'allaitement, peut être exploitée pour éduquer le système immunitaire du fœtus afin de les protéger contre la survenue de pathologies telles que le diabète de type 1, l'asthme ou encore l'hémophilie A.

L'asthme allergique est l'une des maladies allergiques la plus représentée avec une prévalence de 235 millions de personnes affectées dans le monde (Vos et al. 2020). La prévalence de ce type de pathologies augmente avec les années et tout particulièrement dans les pays développés dû à notre style de vie et l'environnement auquel nous sommes exposés dans l'enfance (Illi et al. 2001; Wichmann 1996). L'asthme se caractérise par l'inflammation

chronique des poumons ainsi que l'accumulation de mucus dans les voies respiratoires provoquant des difficultés pour respirer (Fusaro et al. 2007; Holt et al. 1999). Son développement débute par la polarisation de LT CD4⁺ vers le sous type Th2 à la suite de leur activation par des antigènes inhalés ou ingérés, d'ordinaires inoffensifs. Les Th2 activées sécrètent de l'IL-4 induisant la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'IgEs allergène-spécifiques. Les complexes immuns allergène/ IgE fixent les récepteurs FcεR en surface des mastocytes et induisent leur dégranulation et la libération d'amines vasoactives (Metcalf et al. 2009). Lors de la grossesse ou après la naissance, les antigènes ingérés et inhalés par la mère éduquent le système immunitaire fœtal. En effet, il fut proposé que les antigènes contenus dans l'alimentation maternelle traversaient le placenta au stade fœtal et étaient contenus dans le lait maternel (Szépfalusi et al. 2000; Van Duren-Schmidt et al. 1997). La transmission passive des allergènes sous forme de complexes allergènes / IgG contenus dans le lait, médiée par le FcRn, induit une tolérance immunitaire active (Mowat 2003; Worbs et al. 2006). Cependant la mise en place de tolérance nécessite que la mère soit exposée à l'allergène pendant la période d'allaitement (Lambrecht 2018; Polte & Hansen 2008; Verhasselt et al. 2008). Une étude chez la souris a démontré qu'une tolérance plus importante était induite dans la descendance lorsque celle-ci était allaitée par une mère préalablement sensibilisée à l'ovalbumine (OVA), jouant ici le rôle d'allergène, que par une mère non sensibilisée. L'introduction de l'OVA dans la circulation de la progéniture induisait des LT régulateurs spécifiques de l'OVA qui après prolifération suppriment la réponse médiée par les Th2 de façon antigène-spécifique (Mosconi et al. 2010; Ohsaki et al. 2018). Ce mécanisme de protection dépend à la fois du transfert des complexes allergènes/IgG via le FcRn, l'induction de tolérance n'ayant pas eu lieu chez des souris déficientes pour le FcRn nourri par une mère exposée à l'OVA, et de la présence de Tregs allergène-spécifiques, leur déplétion abolissant la protection. Cette protection est durable car elle est maintenue même après la disparition des IgGs maternelles de la circulation des petits (Mosconi et al. 2010). Une fois les CI transférés vers la circulation des nouveau-nés, l'allergène est internalisé par des cellules dendritiques conventionnelles (Ohsaki et al. 2018). Bien que l'allergène soit introduit dans la circulation fœtale par son passage à travers le placenta, la réintroduction de l'antigène dans le lait maternel peut être nécessaire pour développer une protection optimale. Malgré tout, l'efficacité du transfert des complexes IgG/allergène pour réduire la prévalence de l'asthme dans les populations à risque reste à démontrer (Figure 8).

Dans le cas précédent, l'éducation du système immunitaire du fœtus ou du nouveau-né se fait de façon spontanée par le transfert d'antigènes contenus dans la circulation maternelle. Ce mécanisme de transfert d'antigène peut être exploité par la fusion d'antigènes spécifiques à des fragments Fc favorisant leur passage vers la circulation fœtale et l'éducation du système immunitaire fœtal. Ce système a été validée dans deux modèles de pathologies humaines : le diabète de type 1 et l'hémophilie A. Dans le cas de l'hémophilie A la preuve de concept a été discutée dans la partie « Induction de tolérance envers le FVIII thérapeutique VI.7 » (Figure 8).

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune multifactorielle causée par la destruction des cellules β productrices d'insuline du pancréas. Cette pathologie touche de plus en plus de personnes avec une incidence de 9,4 millions d'individus affectés (Gregory et al. 2022). La destruction des cellules β par des cellules T auto-réactives induit une déficience de production d'insuline : le métabolisme du glucose s'en trouve altéré. À terme les patients atteints de DT1 peuvent développer des cécités, des attaques cardiaques et des insuffisances rénales... L'insuline n'est qu'un des antigènes ciblés par les cellules T pathogènes induisant le DT1 (Gonzalez-Duque et al. 2018). En utilisant des souris NOD G9C α qui expriment un TCR transgénique dérivé d'un clone T insuline-réactif et d'un modèle de DT1 spontané NOD, le groupe du professeur Roberto Malone a été capable de réduire l'incidence du TD1 dans la descendance de souris gestantes traitées avec de la pré-proinsuline (PPI) fusionnée au Fc γ 1 murin. Comme dans le cas de l'hémophilie A, l'injection de PPI-Fc pendant la gestation était suivie du transfert des molécules dans la circulation fœtale, de leur capture par les CD migratoires fœtales et de l'induction de cellules Tregs spécifiques. Étonnement, le traitement induisait un recrutement de TCD8 $^+$ à la périphérie plus important mais ces derniers étaient moins cytotoxiques (Culina et al. 2015) (Figure 8).

La capacité du FcRn à la transcytose fut aussi exploitée pour corriger des déficiences d'activités enzymatiques congénitales connues en tant que maladies lysosomales. Ce nom générique comprend un ensemble de pathologies caractérisées par un déficit en enzymes lysosomales provoquant une accumulation de protéines non digérées dans les lysosomes de nombreux organes. Les individus atteints par ces pathologies développent de nombreuses comorbidités pouvant évoluer vers le décès du patient. Les mucopolysaccharidoses (MPS) fait partie de la famille des pathologies lysosomales et est causée par une absence de dégradation

des aminoglycans dans les lysosomes. En particulier, la MPS VII est causée par une absence de l'enzyme B-glucuronidase (GUS) (Cheng et al. 2003).

Ces maladies sont traitées par injection de l'enzyme manquante (Barton et al. 1990, 1991; Wraith 2002). Les thérapies par remplacement enzymatique sont cependant limitées par la rapide élimination des enzymes, par la quantité d'enzymes thérapeutiques nécessaire pour éliminer une faible partie des protéines contenues dans les lysosomes (Winkel et al. 2004) et par le développement d'anticorps neutralisants fixant ces enzymes.

L'injection d'une protéine de fusion composée de GUS et d'un fragment Fc à des souris gestantes présentant une MPS permettait son transfert vers la circulation fœtale de manière FcRn dépendante. Après le passage vers la circulation fœtale, la protéine était distribuée dans le cerveau, la rate, le rein, le foie, le cœur, les poumons et les yeux et résolvait le problème d'accumulation protéique. L'induction de tolérance immunitaire chez les fœtus induite par l'injection de GUS-Fc n'avait cependant pas été évoquée au moment de la publication de cet article (Grubb et al. 2008, 2010).

OBJECTIFS

Objectifs

Lorsque nous faisons état de la littérature sur l'hémophilie A, nous nous apercevons que le traitement des saignements des patients hémophiles A, par l'administration de FVIII thérapeutique, est compliqué par le développement d'une réponse immunitaire contre une protéine autologue. Cette réponse immunitaire, impactant 5 à 30% des patients hémophiles A, se caractérise par le développement d'IgGs neutralisantes, qui inhibent l'activité pro-coagulante du FVIII. Chez ces patients, les injections de FVIII ne permettent pas de restaurer la coagulation et d'assurer une hémostase normale. Le développement d'inhibiteurs du FVIII, est un problème sociétal majeur qui impacte la qualité de vie des patients et de leur famille, et représente un coût important. En effet, le coût de traitement de patients avec inhibiteurs excède 200 000 euros par an et par patient en Europe (Gringeri et al. 2003; O'Hara et al. 2017). L'éradication des inhibiteurs ou la prévention de leur apparition est donc un objectif primordial à atteindre. À ce jour, l'induction de tolérance immunitaire, par injection de fortes doses de FVIII pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois, est la seule stratégie efficace pour éliminer les inhibiteurs chez l'Homme. Néanmoins, elle n'est efficace que chez 70% des patients. Nous savons que le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII repose sur une absence de mise en place de tolérance lors de l'ontogénie des lymphocytes B et T. Nous savons également que cette tolérance commence à se mettre en place lors du développement fœtal. Il y a quelques années, mon laboratoire a démontré que le transfert transplacentaire des domaines A2 et C2 du FVIII, fusionnés au Fc d'une IgG1 murine, permettait une réduction du développement de la réponse immunitaire anti-FVIII chez la descendance. Néanmoins, l'induction de tolérance était incomplète (Gupta et al. 2015). C'est en se basant sur cette étude, que nous avons postulé l'hypothèse que le transfert transplacentaire du FVIII entier pendant le développement fœtal permettrait une induction de tolérance complète et durable au sein de la descendance, prévenant ainsi le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII.

Afin de mener ce projet à bien, il m'a fallu générer un outil promouvant la capture et le transfert vers la circulation fœtale de FVIII maternel. J'ai donc cloné et caractérisé des anticorps monoclonaux monovalents, capables de fixer à la fois le FVIII humain et le FcRn, à partir d'IgG isolées chez des patients hémophiles A avec inhibiteurs (Jacquemin et al. 1998, 2010; van den Brink et al. 2001).

OBJECTIFS

Ensuite, à l'aide d'un modèle de souris hémophiles A, j'ai étudié si mes molécules favorisaient le transfert transplacentaire de FVIII humain exogène vers la circulation fœtale. Pour cela des souris hémophiles A gestantes ont été traitées au 17^{ème} jour de gestation avec du FVIII pré-incubé avec mes différents anticorps anti-FVIII.

Après avoir validé le transfert transplacentaire de FVIII exogène, je devais déterminer si ce système était applicable à une souris exprimant de façon endogène le FVIII humain. Pour cela, j'ai traité des souris hémophiles A avec des vecteurs AAV codant le FVIII humain (McIntosh et al. 2013), pour leur faire exprimer du FVIII humain. J'ai ensuite réalisé des expériences de transfert transplacentaire.

Enfin il m'a fallu déterminer si l'introduction de la protéine FVIII pendant le stade fœtal favorisait le développement d'une tolérance spécifique envers le FVIII. Pour cela après avoir réalisé une expérience de transfert transplacentaire chez des souris gestantes hémophiles A, ou des souris hémophiles A traitées avec des AAV, j'ai traité leur descendance avec du FVIII thérapeutique et monitoré pendant 6 semaines le développement d'une réponse anti-FVIII.

RÉSULTATS

Résultats

I - Transfert materno-fœtal de protéines thérapeutiques par des IgGs modifiées

Le placenta forme une interface privilégiée d'échanges entre la mère et l'enfant. Cet organe excrète les déchets (urée, dioxyde de carbone...) de la circulation fœtale vers la circulation maternelle, et fournit les nutriments, l'eau et l'oxygène nécessaire à la croissance du fœtus (Brosens et al. 2011). Le placenta est également impliqué dans le transfert d'IgGs maternelles. Ce transfert protège le fœtus contre un large spectre de pathogènes, le temps que le système immunitaire de l'enfant soit suffisamment mature pour qu'il puisse produire ses propres IgGs. Chez l'Homme le transfert d'immunité se fait majoritairement *in utero*, et débute pendant la seconde moitié du second semestre de la grossesse (Gitlin & Boesman 1966; Kohler & Farr 1966; Malek et al. 1994, 1996; Simister 2003). À l'inverse, chez les rongeurs, le transfert d'IgGs maternelles se produit principalement au niveau de l'épithélium intestinal (Appleby & Catty 1983; Halliday 1955b,a). Néanmoins, un faible mais non négligeable transfert d'IgGs maternelles se produit via le placenta à partir du 15^{ème} jour de gestation (Appleby & Catty 1983).

La transcytose d'IgGs maternelles dépend de leur fixation au FcRn (McCarthy et al. 2000; Ober et al. 2004a; Ward et al. 2005). En plus d'être utilisé à dessein pour protéger le fœtus contre plusieurs pathogènes via la vaccination maternelle (Benowitz et al. 2010; Englund et al. 1995; Forsyth et al. 2015; Nicoara et al. 1999; Rottenstreich et al. 2021; Tapia et al. 2016; van den Berg et al. 2011; Van Savage et al. 1990), le FcRn peut être exploité pour corriger les déficits en différentes protéines essentielles (Grubb et al. 2008, 2010). Nous avons nous-même démontré, en collaboration avec un autre laboratoire, que le transfert transplacentaire de protéines fusionnées au Fc d'une IgG1 de souris pouvait moduler le système immunitaire fœtal (Culina et al. 2015; Gupta et al. 2015).

L'objectif principal de mon projet de thèse a été de déterminer si je pouvais favoriser le transfert transplacentaire d'antigènes spécifiques, administrés ou exprimés de façon endogène par des souris gestantes à l'aide d'IgG1 monovalentes humaines (FabFc) spécifiques de l'antigène.

Après avoir choisi le FVIII humain, une glycoprotéine complexe organisée en plusieurs domaines, comme modèle de protéine thérapeutique, j'ai généré des FabFcs spécifiques du FVIII, clonées à partir d'inhibiteurs retrouvés chez des patients hémophiles A (Jacquemin et al. 1998, 2010; van den Brink et al. 2001).

À l'aide de femelles gestantes hémophiles A, j'ai démontré que l'administration de mes FabFcs au jour 17.5 de la gestation, permettait le transfert de FVIII exogène vers la circulation fœtale de manière FcRn-dépendante et FcγR-indépendante. L'absence d'implication des FcγRs dans le transfert transplacentaire d'IgGs maternelles à part ailleurs été récemment démontrée (Borghi et al. 2020). Au sein de ce modèle expérimental, les niveaux de FVIII dans la circulation fœtale atteignaient 10% de la concentration en FVIII retrouvée chez l'Homme sain.

Le bolus de FVIII étant rapidement éliminé de la circulation maternelle, en présence ou en absence des FabFcs, j'ai réalisé d'autres expériences de transfert transplacentaire à l'aide d'un modèle de souris exprimant de façon endogène le FVIII humain après traitement par thérapie génique.

À l'aide de ces deux modèles pré-cliniques, j'ai démontré que le transfert transplacentaire était hautement dépendant de la taille de la protéine transférée et, dans le cas du FVIII, j'ai identifié les épitopes favorisant ce transfert transplacentaire.

Cette étude, apporte des résultats prometteurs quant à l'utilisation d'IgGs dans le transfert d'antigènes spécifiques de la mère à l'enfant pour des thérapies de substitutions *in utero*, ou l'induction de tolérance spécifique d'un antigène.

Title. Transplacental delivery of therapeutic proteins mediated by engineered IgG

Authors. Angelina Mimoun,¹ Melissa Bou Jaoudeh,¹ Sandrine Delignat,¹ Victoria Daventure,¹ Alejandra Reyes Ruiz,¹ Maxime Lecerf,¹ Aurélien Azam,¹ Remi Noe,¹ Ivan Peyron,² Olivier D Christophe,² Peter J Lenting,² Valérie Proulle,^{1,3} Jenny McIntosh,⁴ Amit C Nathwani,^{4,5} Jordan D Dimitrov,¹ Cécile V Denis,² Sébastien Lacroix-Desmazes¹

Affiliations. ¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre de Recherche des Cordeliers, CNRS, Sorbonne Université, Université de Paris, F-75006 Paris, France; ²Laboratory for Hemostasis, Inflammation & Thrombosis, Unité Mixte de Recherche 1176, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; ³Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Cochin, AP-HP.Centre, Paris, France; ⁴Department of Haematology, UCL- Cancer Institute, London, United Kingdom; ⁵Katherine Dormandy Haemophilia and Thrombosis Unit, Royal Free London NHS Foundation Trust, London, United Kingdom.

Running heads. Transplacental delivery of protein therapeutics

Correspondence should be addressed to Sébastien Lacroix-Desmazes (sebastien.lacroixdesmazes@inserm.fr). INSERM UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers 15, rue de l'école de médecine, 75006 Paris - France

Word count. 5427 words; 4 figures; 1 supplementary file

Abstract

Transplacental delivery of maternal IgG provides humoral protection during the first months of life until the newborn's immune system reaches maturity. The materno-fetal interface has been exploited therapeutically to replace missing enzymes in the fetus, as shown in experimental mucopolysaccharidoses, or to shape adaptive immune repertoires during fetal development and induce tolerance to self-antigens or immunogenic therapeutic molecules. Here, we investigated whether proteins that are administered to pregnant mice or endogenously present in their circulation may be delivered through the placenta by engineered monovalent IgG (FabFc). Using human factor VIII (FVIII) as a therapeutically relevant model antigen, we show that administration of FabFc to pregnant severe hemophilia A mice mediates the materno-fetal delivery of FVIII in a FcRn-dependent manner. FVIII antigen levels achieved in the fetuses represented 10% of normal plasma levels in the human. We identify antigen/FabFc complex stability, antigen size and shielding of promiscuous protein patches, as key parameters to foster optimal antigen delivery. Our results pave the way towards the development of novel strategies for the *in utero* delivery of endogenous maternal proteins to replace genetically deficient fetal proteins or to educate the immune system and favor active immune tolerance upon protein encounter later in life.

Keywords: hemophilia A, factor VIII, transplacental delivery, neonatal Fc receptor

Introduction

The placenta forms a privileged interface between the mother and the fetus; it excretes wastes (urea, carbon dioxide...) from the fetal circulation and supplies the fetus with nutrients, water and oxygen that are vital for its growth¹. The placenta also mediates the active transfer of maternal immunoglobulin G (IgG). Maternally transferred IgG protect the newborn against a broad spectrum of pathogens until the immune system is mature enough to produce its own IgG. Conversely, the transplacental delivery of maternal IgG may be deleterious to the fetus when the antibodies are specific for self-molecules such as the anti-nuclear Ro/SSA and La/SSB proteins, rhesus antigens or platelets surface glycoproteins, leading to Sjögren's syndrome,² hemolytic disease³ or autoimmune thrombocytopenia.⁴ The transcytosis of maternal IgG initiates with their non-specific fluid phase internalization by syncytiotrophoblasts.^{5,6} Internalized IgG accumulate in acidic EEA1⁺, Rab4⁺, Rab5⁺, and Rab11a⁺ early endosomes and bind to the neonatal Fc receptor (FcRn) upon acidification of the endosome content.⁷ IgG/FcRn complexes then reach the basal pole of the cells; IgG are released from the FcRn in the intercellular space following fusion of the sorting endosomes with the cell membrane and return to neutral pH.⁸ In the human, even though maternal IgG are detected in umbilical cord blood from the eighth week of pregnancy onwards, IgG transfer starts during the second half of the second trimester of gestation.^{9,10} In rodents, a weak but non-negligible transfer of maternal IgG is detected from day 15 of gestation (E15) and peaks at E17; maternal IgG are however mainly transferred via lactation after birth through the intestinal epithelium.¹¹⁻¹³

The FcRn-mediated transplacental delivery of molecules can be exploited for therapeutic purposes. Vaccination of pregnant women elicits protective IgG that are transferred to the fetuses and protects the newborns against flu, diphtheria, pertussis, pneumonia or SARS-Cov2.^{14,15} The *in utero* therapeutic replacement of missing lysosomal enzymes was achieved

in a mucopolysaccharidosis VII pre-clinical model, where the Fc-fused beta-glucuronidase injected to pregnant mice crossed the placenta, reached the fetal circulation and restored lysosomal digestion of accumulated proteins.¹⁶ Fc-fused proteins administered to pregnant mice also shape the immune system of the offspring following transplacental delivery. Transplacentally delivered proteins thus alter the T-cell repertoire of the offspring¹⁷ and elicit antigen-specific regulatory T cells that are protective against antigen challenge¹⁸ or development of spontaneous autoimmunity¹⁹ later in life. Based on these observations, we hypothesized that native proteins administered to pregnant mice or endogenously present in their circulation may be deliberately delivered to the fetus through the placenta for therapeutic purposes.

Using human factor VIII (FVIII) as a therapeutically relevant model antigen, and engineered monovalent IgG (FabFc) specific for FVIII, we show that exogenous FVIII was delivered from the circulation of the mothers to that of the fetuses upon binding to anti-FVIII FabFc, at protein levels that corresponded to 10% of the normal FVIII plasma levels in the human. The transfer of FVIII required binding of the FabFc to the FcRn. Binding of FabFc to the mother's FcγRs only remotely influenced the FabFc-mediated transplacental delivery of FVIII. We finally identified stability of the antigen/antibody complex, size of the antigen and shielding of promiscuous protein patches on the FVIII light chain as key parameters to foster optimal protein delivery, thus paving the way towards the development of *in utero* replacement therapy and induction of active specific immune tolerance.

Results

Monovalent IgG-mediated transplacental delivery of FVIII

Using the VH and VL genes of the human monoclonal anti-FVIII IgG KM33,²⁰ we generated a monovalent monoclonal anti-FVIII IgG, referred to as KM33 FabFc. KM33 FabFc possesses

a single antigen-binding site and a complete Fc fragment stabilized by a linker peptide (**Fig. 1A**). KM33 FabFc bound and neutralized FVIII to the same extent as the original IgG (**Fig. 1B** and **Table S1**). KM33 IgG is specific for the C1 domain of FVIII and inhibits the binding of FVIII to VWF. Accordingly, KM33 FabFc competed in a dose-dependent manner with VWF for binding to FVIII (**Fig 1C**).

Human recombinant B domain-deleted FVIII was injected either alone or following pre-incubation with KM33 FabFc at a 1:1 molar ratio to naïve pregnant FVIII-KO mice at day E17.5 of gestation. The dissociation constant (K_D) that characterizes the binding of KM33 IgG to FVIII is equal to 0.1 nM.²⁰ Assuming that KM33 FabFc has a similar affinity as the complete IgG, >97% of the FVIII is expected to be bound to the FabFc at the time of injection to pregnant mice. Plasma from fetuses was obtained 4 hours following injection of the mothers. FVIII was not detected in the fetuses' plasma when it was injected alone (**Fig. 1D**). In contrast, FVIII were detected in the fetuses' plasma following co-injection with the FabFc, FVIII (**Fig. 1D**); different ELISA setups allowed the detection of FVIII and of the KM33 FabFc/FVIII complex, as well as that of KM33 FabFc. The circulating FVIII antigen concentration in fetuses' plasma was estimated to be 0.13 ± 0.11 nM, which represents about 10% of the normal FVIII plasma levels in the human (i.e., 1.22 ± 0.56 nM).²¹

We generated a mutant KM33 FabFc^{IHH} that bound to FVIII with a similar dose-dependency as the native KM33 FabFc (**Fig. S1A**) and demonstrated no affinity for mouse FcRn (**Table 1**). FVIII pre-incubated with KM33 FabFc^{IHH} was not delivered from the mothers' circulation to that of the fetuses (**Fig. 1D**), indicating that the KM33 FabFc-mediated transplacental delivery of FVIII requires binding to the FcRn.

We also engineered a KM33 FabFc^{N297A} mutant that lacks binding capacity to mouse Fc γ R (**Fig. S1B**) but retains unaltered binding to FVIII and FcRn (**Fig. S1A, Table 1**). The transplacental delivery of KM33 FabFc^{N297A} was 2-fold greater than that of the native KM33

FabFc (**Fig. S2**, $P < 0.0001$). In agreement, the amounts of FVIII delivered by KM33 FabFc^{N297A} from the mothers' circulation to that of the fetuses (0.19 ± 0.07 nM) were statistically ($P = 0.0355$), though biologically marginally, greater than that delivered by the native KM33 FabFc (0.12 ± 0.02 nM). Because amounts of FVIII transcytosed by the FabFc^{N297A} mutant exhibited high variability among fetuses, we used non-mutated FabFc in the rest of the study.

Stability of the FVIII/FabFc complex in the mothers' circulation and upon transplacental delivery

Four hours following injection to the mothers, the levels of KM33 FabFc detected in the fetuses' plasma were 20 to 60-fold greater than that of FabFc-bound FVIII or FVIII (**Fig. 1D**), suggesting dissociation of the complex. To compare the kinetics of elimination of KM33 FabFc and FVIII in the mothers' circulation, blood was collected 5 min and 4 hours following injection of FVIII alone or pre-incubated with KM33 FabFc. The circulating concentration of FVIII injected with KM33 FabFc decreased faster than that of the FabFc (2.8 ± 1.1 nM/hr versus 0.2 ± 0.1 nM/hr, respectively, $P = 0.0286$) during the 4 hours that followed injection (**Fig 2A**). Accordingly, the FVIII/FabFc molar ratio in the mothers' plasma was close to 1.5 ± 0.7 (mean \pm SD) 5 min following injection, and 0.2 ± 0.5 4 hours later (**Fig 2B**), indicating a 5-fold faster elimination of FVIII from the mothers' circulation than the FabFc.

The elimination rate of FVIII pre-incubated with KM33 FabFc did not differ from that of FVIII injected alone (41.2 ± 49.1 nM/hr, $P = 0.0635$). This suggests that the elimination of FVIII from the mothers' circulation is mediated by FVIII-specific receptors, and is not rescued upon binding of FVIII by FabFc. Of note, the elimination rate of KM33 FabFc was similar whether the molecule was injected alone (0.1 ± 0.1 nM/hr) or following pre-incubation in the presence of FVIII (0.2 ± 0.1 nM/hr, $P = 0.257$). Human FVIII accumulates rapidly in the spleen and liver following injection to FVIII-KO mice.²² In agreement, FVIII pre-incubated with KM33 FabFc

was detected in the spleen and liver 30 min following injection (**Fig 2C**). While some co-localization between FVIII and KM33 FabFc was evidenced, $65\pm 68\%$ of the FVIII signal in the liver and $95\pm 5\%$ of the FVIII signal in the spleen were not associated with that of KM33 FabFc, thus further confirming dissociation of the complex *in vivo* in the mothers' organism.

The FVIII/FabFc molar ratios measured in the fetuses' plasma 4 hours following injection to the pregnant mice (0.017 ± 0.005) were 86 and 12-fold lower than that detected in the mothers 5 min and 4 hours after injection, respectively (**Fig. 2B**), indicating further dissociation of the complex upon placental crossing. The co-localization of FVIII with syncytiotrophoblasts did not differ whether it was injected alone or in the presence of KM33 FabFc (**Fig. 2D**) or KM33 FabFc^{IHH} (**Fig. S3**), suggesting that accumulation of FVIII at the level of the placenta is not dependent on the FabFc and on binding to the FcRn. The interaction of KM33 FabFc with FVIII was stable at pH as low as pH 4 as shown in ELISA (**Fig. 2E**), suggesting that the poor transcytosis of the FVIII/FabFc complex is not due to the dissociation of the complex at the acidic pH that characterizes the early endosomes.

In order to investigate whether a covalent association between FVIII and FabFc would improve the yields of transplacental delivery of FVIII, pregnant FVIII-KO mice were injected with a commercially available Fc-fused recombinant FVIII, Eloctate® (rFVIII-Fc). The rate of elimination of rFVIII-Fc in the mothers' circulation (3.2 ± 2.5 nM/hr) was identical to that of FVIII pre-incubated with KM33 FabFc ($P>0.9$, **Fig. 2A**). Interestingly, rFVIII-Fc was significantly less transcytosed than FVIII co-incubated with KM33 FabFc (**Fig. 2F**, $P<0.0001$). Because KM33 FabFc was efficiently delivered to the fetuses (**Fig. S2**), the data suggest that the poor transplacental delivery of FVIII (either fused to the Fc fragment or in complex with FabFc) is due, for a large part, to the retention of the FVIII moiety in the syncytiotrophoblast cells.

Considering total blood volumes of 1.5 ml and 60 μ l for pregnant mice and fetuses, respectively (i.e., 58.5 ml/kg),²³ the data indicate that 4 \pm 1% of the FVIII injected to the mothers reached the circulation of the fetuses in 4 hours.

Transplacental delivery of endogenous maternal FVIII

In our experimental setup, 90 \pm 5% of the exogenously administered FVIII (**Fig. 2A**) was eliminated from the mothers' circulation within 4 hours. We performed additional experiments wherein human FVIII is produced endogenously in the mothers and permanently present in the circulation. Naïve FVIII-KO females were treated with 2.10¹³ AAV8 vg/kg containing the FVIII_{V3} transgene.²⁴ FVIII production peaked 2 weeks following treatment and gradually decreased over the next 10 weeks (**Fig. 3A and Fig. S4**). The decreased expression is not due to the development of anti-FVIII neutralizing IgG (data not shown). At week 2, mice were mated. Mice became pregnant between 2 to 16 weeks following mating. Endogenous FVIII was still detectable in the pregnant mice at the time of transplacental delivery experiments (4.1 \pm 1.9 nM, range: 2.3 to 7.8 nM, **Fig. 3B**), concentrations that are in the same range as that found in the plasma of human female carriers of hemophilia A.²⁵

AAV-treated FVIII-producing pregnant mice were administered 3 different doses of KM33 FabFc at E17.5. FVIII and FabFc were quantitated 4 hours later in the fetuses' plasma. While the transplacental delivery of KM33 FabFc was confirmed in the case of the two highest doses (i.e., 4 μ g and 1.5 μ g, **Fig. 3C**), that of FVIII was only marginal, and only detected with the highest FabFc dose (**Fig. 3D**). Injection of KM33 FabFc^{IHH} to pregnant FVIII-producing pregnant mice led to background transcytosis of FVIII to the fetuses. The data indicate that the constant endogenous production of FVIII by the mothers does not increase the amounts of FVIII that are transplacentally delivered to the fetuses by the FabFc.

Parameters governing the transplacental delivery of FVIII

In addition to KM33, that is specific for the C1 domain of FVIII, we generated BOIIB2 FabFc and BO2C11 FabFc, that are specific for the A2 and C2 domains of the molecule, respectively (**Fig. S5A**). Both BOIIB2 and BO2C11 IgG originate from inhibitor-positive patients with hemophilia A.^{26,27} The three FabFc recognized immobilized FVIII in a dose-dependent manner (**Fig. 1B** and **Fig. S5B**) and were strong inhibitors of FVIII pro-coagulant activity (**Table S1**). BO2C11 competed with VWF for binding to FVIII, while BOIIB2 did not (**Fig. S5C**). BOIIB2 and BO2C11 had similar affinities for the FcRn (**Table S2**) and bound to FVIII *in vitro* at a large pH range (pH 3 to 8, **Fig. S5D**). Naïve pregnant FVIII-KO mice were injected with FVIII pre-incubated with BOIIB2 or BO2C11 FabFc; levels of transcytosed FVIII were measured in the fetuses' plasma 4 hours later. While substantial levels of FVIII were detected in the fetuses' plasma in the case of BO2C11 FabFc, FVIII was poorly transplacentally delivered when injected with BOIIB2 FabFc (**Fig. 4A**). The FVIII levels measured in fetuses' plasma were normalized as a function of the concentration of FabFc (**Fig. 4B**): in the case of KM33 FabFc, the transplacental delivery of FVIII was 5-fold greater than in that of BOIIB2 FabFc ($P < 0.0001$) and 4-fold lower than in the case of BO2C11 FabFc ($P = 0.0001$), indicating that the epitope specificity of the FabFc impacts the transcytosis capacity.

Using KM33 FabFc and BO2C11 FabFc, we then investigated whether the size of the antigen impacts the transcytosis efficacy. The FabFc were incubated with full-length recombinant FVIII (that contains the B domain of the molecule, MW of 280 kDa) or with B domain-deleted (BDD) FVIII (MW of 165 kDa, used in all preceding experiments), prior to injection to pregnant mice. BO2C11 FabFc was also incubated with the recombinant C2 domain of FVIII (MW of 19 kDa). For both FabFc, the transplacental delivery was greater for BDD FVIII than full-length FVIII (**Fig. 4C**, $P < 0.0001$). The transplacental delivery of C2 by BO2C11 FabFc was 100-fold greater than that of BDD FVIII ($P = 0.0002$). Because both KM33 and BO2C11 FabFc, in contrast to

BOIIB2 FabFc, neutralize the binding of FVIII to VWF (**Fig. 1C** and **Fig. S5C**), we investigated whether BOIIB2 FabFc may foster the transplacental delivery of FVIII in the absence of endogenous VWF, the natural chaperone of FVIII in the blood. In contrast to our hypothesis, FVIII was not better transcytosed by BOIIB2 FabFc in double FVIII/VWF-KO mice than in FVIII-KO mice (**Fig. 4D**).

Discussion

Here, we investigated whether a therapeutic molecule may be intentionally delivered through the placenta during pregnancy from the blood of the mother to that of the fetus. We have already documented in the mouse the transplacental delivery of the first domain of hemagglutinin¹⁸, of pre-pro-insulin¹⁹ and of the two immunodominant A2 and C2 domains of FVIII,¹⁸ all fused to the mouse Fc γ 1. Other groups have demonstrated the transfer from the mothers to the fetuses of Fc-fused erythropoietin²⁸ and beta-glucuronidase.¹⁶ The choice of human FVIII as a model antigen in the present study was motivated by the structural and biochemical complexity of this multi-domain glycoprotein, by the existence of different therapeutic variants of the molecule: full length, B domain-deleted and Fc-fused FVIII,²⁹ by the availability of different patient-derived FVIII-specific monoclonal IgG and by the clinical relevance of the molecule.

FVIII did not cross the placenta alone. This was true both when FVIII was injected as a bolus of 50 μ g of exogenous FVIII (leading to a concentration of FVIII in the pregnant mice plasma of 15 to 108 nM 5 min following injection) or when FVIII was present as an endogenous molecule at a constant concentration ranging from 2 to 8 nM in pregnant mice having undergone gene therapy. This observation is consistent with the documented absence of maternal FVIII in the cord blood of fetuses with severe hemophilia A, a phenomenon exploited in the past to diagnose hemophilia A before the birth of the babies.³⁰

The transplacental delivery of FVIII was explored in three experimental setups using pregnant mice: i) exogenous therapeutic FVIII was pre-incubated with engineered monovalent (FabFc) anti-FVIII IgG prior to injection to FVIII-deficient mice, ii) mice producing endogenous human FVIII following gene therapy were treated with an anti-FVIII FabFc, iii) FVIII-deficient mice were injected with a therapeutic Fc-fused FVIII. In all cases, FVIII was delivered from the mothers' circulation to that of the fetuses. In the case of FabFc-mediated FVIII transfer, the FabFc originated from neutralizing monoclonal anti-FVIII IgG, it was therefore not possible to measure the FVIII pro-coagulant activity in the fetuses' plasma. Yet, the amounts of FVIII protein reached up to 10% of the physiological FVIII plasma levels,²¹ i.e., levels that are sufficient to prevent minor bleeds in patients with hemophilia A and provide protection against joint degradation.³¹ In 4% of the cases, the birth of a baby with severe hemophilia A is complicated by intracranial hemorrhages that may be fatal or result in serious neurological impairment.³² In this context, the supply of low amounts of pro-coagulant FVIII using non-inhibitory anti-FVIII FabFc to the fetal circulation at the time of delivery may protect the newborn from dramatic intracranial bleeds.

The preliminary results that motivated initiation of the present study had shown the transplacental delivery of the recombinant FVIII C2 domain by the native BO2C11 IgG (data not shown). Our decision to use engineered FabFc over native IgG was motivated by: i) the reduced size of FabFc (100 kDa) as compared to that of IgG (150 kDa), ii) the FabFc monovalency as opposed to IgG bivalency that warrants a lower size of the antibody/antigen complexes, a critical parameter in the case of FVIII where binding of 2 FVIII molecules to one IgG would lead to a >490 kDa complex, iii) the reduced risk of forming large immune complexes on cell surfaces and crosslinking Fc γ R, iv) the potential for using cocktails of FabFc targeting different epitopes without crosslinking several antigens. All this should translate into

improved FcRn-mediated transfer and reduced risk for triggering deleterious inflammatory responses.

The three different FVIII-specific FabFc used in our study yielded different amounts of transcytosed FVIII: FVIII was better transcytosed by BO2C11 than by KM33, and only poorly by BOIIB2 FabFc. The three FabFc share common features such as a human Fc γ 1 fragment and a strong inhibitory activity towards FVIII (1400 to 7400 BU/mg). They however differ in terms of epitope specificity and capacity to prevent or not the binding of VWF to FVIII. VWF is the natural chaperone for FVIII in blood and the interaction between both molecules is indispensable to prevent the fast elimination of FVIII.³³ The interaction involves key residues in the C1 and C2 domains of FVIII.³⁴ In our experiments, exogenous FVIII was injected in amounts that exceed the binding capacity of endogenous VWF; accordingly, FVIII was rapidly eliminated from the mothers' blood within the 4 hours of the observation period. The fast elimination of FVIII from the mothers' circulation and its accumulation in the mothers' liver and spleen probably account at least in part for the poor transplacental delivery of FVIII, as a consequence of insufficient amounts of circulating FVIII for an insufficient amount of time. However, in mice treated with AAV-FVIII, the endogenous production of FVIII at levels that do not saturate endogenous VWF failed to improve FabFc-mediated transplacental FVIII delivery. This suggests that the absence of stabilization of FVIII by mothers' VWF is not a key parameter for efficient FVIII transcytosis. The A2 domain-specific BOIIB2 FabFc, that does not compete with VWF for binding to FVIII, failed to mediate FVIII transcytosis both in the presence and absence of endogenous VWF, further suggesting that VWF is not the main contributor to the limited transplacental FVIII delivery.

It is tempting to interpret the results of the increased FVIII delivery by the C1 or C2 domain-specific FabFc, in terms of promiscuity of the C1 and C2 domains of the FVIII light chain. The FVIII light chain has been implicated in the binding of FVIII to catabolic receptors such as

LRP.³⁵ Interestingly, the mouse placenta expresses several receptors implicated in the catabolism of FVIII in the mouse³⁶ or by human cells.^{37,38} We and others have shown in the past that both C domains play a key role in the endocytosis of FVIII by human and murine dendritic cells.^{39,40} We have also recently documented the binding of the C1 and C2 domains to platelet GPVI when FVIII is not shielded by VWF.⁴¹ The important residues targeted by the paratopes of KM33 and BO2C11 in the C1 and C2 domains have been identified: mutations to Ala of Arg2090, Lys2092, Phe2093 in C1 and of Arg2215 and Arg2020 in C2 abrogate the binding of the antibodies to FVIII.^{39,40} Importantly, positively charged His, Lys and Arg amino-acid residues favor binding to cell membranes. We hypothesize that the C1 and/or C2 domains of FVIII engage unknown molecular interactions following FVIII internalization in the early endosomes of the syncytiotrophoblast. Such interactions may favor the routing of FVIII towards lysosomal degradation rather than towards recycling endosomes. BIVV001 is a recently described molecule with a largely extended half-life that is independent from binding to endogenous VWF.⁴² In the molecule, the C1 and C2 domains as well as part of the A3 domain are shielded by a recombinant D'D3 moiety.⁴³ Whether BIVV001 demonstrates increased transplacental delivery as compared to FVIII molecules that retain C1/C2-dependent binding promiscuity, remains to be investigated.

The size of the molecules appeared as a critical parameter in the potency for transplacental delivery. This result is potentially biased in the case of larger molecules, where the engagement of additional non-FcRn receptors in the early endosome of the syncytiotrophoblast may favor routing of the molecules towards the lysosomal degradation pathway. Indeed, full length FVIII, which was less transcytosed than BDD FVIII, contains a B domain that is rich in N-linked glycans and interacts with additional catabolic receptors.⁴⁴ Conversely, the C2 domain was extremely well transcytosed by BO2C11 FabFc, that binds and shields its charged amino-acids.^{40,45}

Our results provide the proof of concept that proteins can be transferred from mothers to the fetuses using engineered monovalent IgG. We identify here the size of the protein, the careful choice of the epitope targeted by the FabFc and the shielding of charged amino-acid residues to reduce protein promiscuity, as key parameters to ensure optimal transplacental delivery. An additional important element to take into consideration is the binding affinity of the FabFc for the target molecule and notably the kinetic parameter that govern dissociation of the complex: our results suggest that rapid dissociation of the FabFc/protein complex in the mother's circulation disfavors transplacental delivery. *In vitro* affinity maturation of the FabFc, that typically improves the k_{off} value without impacting the k_{on} , is a promising solution to foster transplacental delivery.⁴⁶ We also demonstrate that protein transfer from the mother to the fetus may be achieved in different settings. Already existing therapeutic Fc-fused molecules (e.g., rFVIII_{FC}, rFIX_{FC}, monoclonal antibodies, ...) may be directly administered during pregnancy. Alternatively, FabFc may be injected alone when the protein is expressed endogenously in the mothers in sufficient amounts, or as a preformed complex with the exogenous recombinant protein. The transfer of proteins from the mothers to the fetuses may have clinical repercussions in the context of replacement therapy, for instance in the case of monogenic coagulation or lysosomal disorders,¹⁶ as well as to shape the immune repertoires during the ontogeny of the immune system, so as to favor the generation of protein-specific regulatory T cells and establishment of long-lasting active immune tolerance.¹⁸

Materials and Methods

Production of FVIII-specific FabFc

BOIIB2, KM33 and BO2C11 FabFc were derived from anti-FVIII IgG isolated from patients with hemophilia A.^{20,26,27} The cDNA encoding the variable region (V) genes of the light chains were cloned in plasmids encoding the constant human kappa light chain, using the In-fusion®

cloning kit following manufacturer recommendations (Takara Bio, Shiga Prefecture, Japan). The cDNA encoding the variable region (V) genes of the heavy (H) were cloned in plasmids encoding the constant heavy chain of human Fc γ 1 separated from a second constant heavy chain of human Fc γ 1 by a flexible (GGGS)₄ linker, to generate a polypeptide chain with the VH-CH1-CH2-CH3-linker-CH2-CH3 structure. The heavy chain and light chain encoding plasmids were co-transfected into non-adherent ExpiHEK human embryonic kidney cells (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). After seven days of culture, supernatants were collected and FabFcs were purified on a HiTrapTM rProtein A FF sepharose column (Cytiva, Marlborough, Massachusetts).

FVIII binding ELISA

Full-length FVIII (Advate®, Takeda, Osaka, Japan) was immobilized on ELISA plates (Thermo Scientific) at 2.5 μ g/mL. Following blocking with PBS,3% BSA (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri), FabFc and the corresponding IgG diluted in blocking buffer (66.7 nM to 0.001 nM) were added to the plate. FVIII-bound IgG and FabFc were detected with a mouse anti-human IgG Fc conjugated to HRP (9040-05, Southern Biotech, Birmingham, Alabama) or with a goat anti-human Ig Fc conjugated to HRP (2047-05, Southern Biotech) and the OPD substrate (Sigma Aldrich). The optical density was measured at 492 nm with an ELISA plate reader (TECAN Infinite 200 ®, Männedorf, Switzerland). When indicated, IgG and FabFc (13 nM) were incubated in FVIII-coated plates in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, at pH ranging from 3 to 8, prior to revelation with anti-human Fc antibodies and substrate.

Inhibition of FVIII binding to VWF by FabFc and IgG

FabFc and IgG (10 to 0.007 nM) were pre-incubated with 0.2 nM (0.06 μ g/mL) of full-length FVIII (Advate®) at 37°C for 30 min in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3% BSA buffer, and

added for 1 hour at 37°C on VWF, (10 µg/mL, Wilfactin[®], LFB, Les Ulis, France)-coated ELISA plates. The residual VWF-bound FVIII was detected with a biotinylated mouse monoclonal anti-A2 domain IgG (1 µg/mL, GMA8015, Green Mountain Antibodies, Burlington, Vermont) or with a biotinylated mouse anti-C2 domain IgG (1 µg/mL, ESH8, Sekisui Diagnostics, Burlington, Massachusetts) prior to addition of streptavidin-HRP (R&D system, Minneapolis, Minnesota) and TMB substrate (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts). The optical density was measured at 450 nm with an ELISA plate reader (TECAN Infinite 200 ®).

Binding of FabFc to the mouse neonatal Fc receptor (FcRn)

The binding kinetics of FabFc to FcRn were measured by surface plasmon resonance (Biacore, Cytiva). A recombinant biotinylated mouse FcRn (5 µg/mL, Immunitrack, København, Denmark) was immobilized on a streptavidin sensor chip (Cytiva) to reach a protein surface density of 0.5 ng/mm² (or 500 resonance units (RU)). FabFc (0.04 to 25 nM) diluted in 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5% glycerol, and 0.1% tween 20 pH6, were injected at a flow rate of 30 µL/min at 25°C. The association and the spontaneous dissociation phases were followed for 4 and 5 min, respectively. Chip surface was regenerated upon injection of 100 mM Tris, 100 mM NaCl pH7, at a flow rate of 30 µL/min for 30 seconds. Data analysis was performed using BIAevaluation version 4.1 software (Biacore Life Science). The K_{on} and k_{off} were calculated using the Langmuir binding model, and the constant affinity K_D was calculated as k_{off}/k_{on} .

Binding of FabFc to mouse FcγR

CHO-transfected cells with FLAG-tagged murine FcγRI (CD64) and FcγRIIb (CD32B) were a gift from Dr. Bruhns (Institut Pasteur, Paris, France).⁴⁷ CHO cells expressing mFcγRI were

selected with 0,5 mg/mL of Zeocin (InvivoGen, San Diego, California) and 2 mg/mL of G418 (Life technologies), and CHO cells expressing Fc γ RIIb were selected with 2 mg/mL of G418. Cells were incubated with 10 nM of FabFc in RPMI 1640, 0.5% FCS for 1 hour at 4°C followed by an incubation with a PE-conjugated goat F(ab')₂ anti-human Fc (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). Binding of FabFc to mFc γ RI or mFc γ RIIb expressing CHO cells was measured by flow cytometry with LSR II following exclusion of dead cells with the fixable viability dye eFluor 780 (Thermo Fisher Scientific), and analysed using the FlowJo software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Animals

Six to twelve-week old FVIII exon 16 knock-out (FVIII-KO) mice and double von Willebrand factor (VWF)/FVIII-KO mice on the C57Bl6 background were used. Animals were handled in agreement with local ethical authorities (approval by Charles Darwin ethics committee, authorizations APAFIS#8219-2016121917406953 v3 and APAFIS#30960-2021070116253589 v4).

***In vivo* AAV gene transfer and FVIII expression**

Six-week old FVIII-KO females were injected retro-orbitally (200 μ L) with AAV8 FVIII-V3²⁴ (2×10^{13} vg/kg) containing a codon-optimized BDD FVIII transgene, diluted in PBS containing 0.025% human serum albumin. Transgenic FVIII in mouse plasma was followed by ELISA and functional coagulation assay for 2 weeks before mating most of them. Transgenic FVIII antigen was detected by ELISA using a monoclonal mouse anti-C2 FVIII domain IgG (1 μ g/mL, ESH8, Sekisui Diagnostics) as capture antibody, and a biotinylated monoclonal mouse anti-A2 FVIII domain (1 μ g/mL, GMA8015, Green Mountain) as a detection antibody, as well as streptavidin-HRP (R&D systems), and the TMB substrate (Thermo Scientific). The pro-coagulant activity

of transgenic FVIII was measured in a functional chromogenic coagulation assay (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). For both assays, human standard plasma (Siemens) was used as a standard. Females were mated 2 weeks following gene therapy and used for transplacental delivery experiments at E17.5 of pregnancy (i.e., within 4 to 18 weeks following mating).

Transplacental delivery of FVIII

To study the transplacental delivery of exogenous FVIII, naïve FVIII-KO pregnant mice at E17.5 were injected (200 µl in the retro-orbital vein) with different molecules: BDD FVIII (50 µg, NovoEight®, Novo Nordisk), full-length FVIII (70 µg, Helixate®, Bayer), rFVIII_{FC} (50 µg, Eloctate®, Sanofi), FVIII pre-incubated with FabFc (29.1 µg) in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂ pH7.4 for 30 min at 4°C. FabFc (29.1 µg) was also pre-incubated with the home-made recombinant C2 domain⁴⁸ of FVIII at 5.5 µg prior to injection. To study the FabFc-mediated transplacental delivery of endogenous FVIII, E17.5 FVIII-KO pregnant mice expressing transgenic FVIII following AAV gene transfer (4.1±1.9 nM, Fig 3B), were injected (200 µl in the retro-orbital vein) with 0.15, 1.5 or 4 µg FabFc. Blood was collected on citrated tubes (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) from the pregnant mothers 5 min and 4 hours following injection, and from the fetuses at 4 hours, plasma was prepared and saved in aliquots at -80°C degrees until use.

Detection of FabFc in mouse plasma

Capture of native FabFc and FabFc^{N297A} was achieved using a mouse anti-human IgG Fc (LS-C69574, LSbio, Seattle, Washington) and that of FabFc^{IHH} was achieved by coating a goat anti-human kappa (2060-01, Southern biotech). Following incubation with mouse plasma, native FabFc and FabFc^{N297A} were revealed using a mouse anti-human IgG Fc conjugated to HRP (9040-05, Southern Biotech) and FabFc^{IHH} was revealed with a goat anti-human Fc Ig-HRP

(2047-05, Southern Biotech). KM33 FabFc, KM33 FabFc^{N297A}, and KM33 FabFc^{IHH}, were quantified in mice plasma using the corresponding purified FabFc as standard. The optical density was measured at 492 nm after addition of the OPD substrate (Sigma Aldrich).

Detection of exogenous FVIII and C2 domain in mouse plasma

FVIII alone or pre-incubated with the anti-C2 domain BO2C11 or with the anti-A2 domain BOIIB2 FabFc was captured with a home-produced monoclonal human anti-FVIII C1 domain IgG (LE2E9).⁴⁹ FVIII pre-incubated with the anti-C1 domain KM33 FabFc was captured with the human monoclonal anti-FVIII A2 domain IgG (BOIIB2). rFVIII¹⁻² was captured with a mouse monoclonal anti-FVIII A2 domain IgG (GMA8015, Green Mountain) and a mouse monoclonal anti-C2 domain IgG (ESH8, Sekisui Diagnostics, Burlington, Massachusetts). FVIII was revealed with a biotinylated polyclonal sheep anti-FVIII antibody (SAF8C Biot, Affinity biological, Ontario, Canada), streptavidin-HRP (R&D system), and the TMB substrate (Thermo Scientific). The FVIII C2 domain was captured with a mouse monoclonal anti-FVIII C2 domain (GMA8026, Green Mountain) and was then revealed with a biotinylated monoclonal mouse anti-His tag IgG (BAM050, R&D system), streptavidin-HRP (R&D system), and the TMB substrate. Exogenous FVIII, rFVIII¹⁻² and the C2 domain were quantified in mice plasma using BDD FVIII (Novoeight ®), full-length FVIII (Helixate ®), rC2 (homemade) and rFVIII¹⁻² (Eloctate ®) as standard respectively. The OD was measured at 450 nm.

Detection of FVIII and KM33 FabFc immune complexes in mouse plasma

FVIII / anti-C1 domain KM33 FabFc immune complexes were captured with a mouse anti-human IgG Fc (LS-C69574, LSbio, Seattle, Washington). FVIII/KM33 immune complexes were revealed with a biotinylated polyclonal sheep anti-FVIII antibody (SAF8C Biot, Affinity biological), streptavidin-HRP (R&D system), and the TMB substrate (Thermo Scientific).

Immune complexes were quantified in mice plasma using FVIII pre-incubated 30 min at 4°C with KM33 FabFc in equimolar ratio as standard.

Immuno-fluorescence on mouse tissues

To collect spleens and livers, mice were sacrificed 30 minutes following injection with FVIII with or without FabFc and perfused with pre-warm PBS (Life Technologies). To collect placentas, mice were sacrificed 4 hours after treatment. Organs were collected, stored in formaldehyde 4% (Sigma Aldrich) for 12 hours and incubated successively in solutions of 15% and 30% sucrose (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri) for 12 hours each. Organs were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Eight µm sections were cut from frozen tissues with a LEICA CM1850 cryostat (Leica Biosystem, Wetzlar, Germany) and stuck onto Menzel Glaser superfrost slides (Thermo Scientific). In the case of spleens and livers, tissues were fixed with 10% neutral buffered formalin (Sigma Aldrich) for 5 minutes at room temperature and permeabilized with 0.2% tween 20 (Sigma Aldrich) for 15 minutes at room temperature. Endogenous biotin and avidin were blocked (Invitrogen Waltham, Massachusetts). In the case of placentas, tissues were fixed and permeabilized with cold acetone for 10 minutes. Fixed placentas were then blocked with PBS, 5% fetal calf serum, 1% BSA. FabFc was revealed with a biotinylated cross-absorbed goat anti-human Fab mouse (2043-08, Southern Biotech) and streptavidin conjugated to AF555 (S32355, Invitrogen). FVIII was revealed with the polyclonal sheep anti-human FVIII (SAF8C AP, Affinity biological) and a mouse- and human-crossed absorbed donkey anti-sheep IgG conjugated to AF647 (A21448, Invitrogen). Syncytiotrophoblast cells were detected with a rat anti mouse Ly-6A/E or Sca-1 (14-5981-82, eBioscience™, Thermo Scientific) and a goat anti-rat IgG (H+L) conjugated to AF488 (A11006, Invitrogen). Microscope slides were mounted with Prolong gold antifade media (Invitrogen). The stained sections were visualized with a Zeiss LSM 710 confocal microscope (63X) (Zeiss, Iena, Germany), and pictures were analyzed with Zeiss Zen software.

Authors contributions:

Designed the research	SLD, CD, OC, PL, VP
Performed the experiments	AM, MBJ, ARR, VD, SD, ML, AA, RN, IP, JDD
Analyzed the data	AM, MBJ, ARR, SD, SLD
Contributed essential material	JMI, AN
Wrote the article	AM, SLD

The authors declare no conflict of interest relevant to this work. JMI, AN are inventors on a patent licensed to BioMarin.

Acknowledgements

We thank Dr Pierre Bruhns (Institut Pasteur, France), Dr Sune Justesen (Immunitrack, Denmark) for providing us with mouse Fc γ R-expressing cells and mouse FcRn, respectively, and the staff from “Centre d'Expérimentation Fonctionnelle” at Centre de Recherche des Cordeliers (Paris) for assistance. Novoeight, Eloctate and Kovaltry were kind gifts from Novo Nordisk A/S (Måløv, Denmark), Sanofi-Genzyme (Cambridge, MA) and Swedish Orphan Biovitrum AB (Stockholm, Sweden), and Bayer Biopharmaceutical (Berkeley, Ca), respectively. Imaging was performed at the Centre d'Histologie, d'Imagerie Cellulaire et de Cytométrie (CHIC), a member of the Sorbonne Université Cell Imaging and Flow Cytometry network (LUMIC) and UPD cell imaging networks.

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Sorbonne Université, Université de Paris, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris and funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie

grant agreement n°859974 (EDUC8) and by grants from Agence National de la Recherche (ANR-18-CE17-0010-02, n°18181LL, Exfiltrins), Sanofi-Genentech (Waltham, MA) and (Swedish Orphan Biovitrum AB (Höllviksnäs, Sweden), and CSL-Behring (Paris, France). AM, MBJ and ARR were recipients of fellowships from Agence National de la Recherche (ANR-18-CE17-0010-02, n° 18181LL) from Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation and from MSCA-ITN EDUC8 (n°859974).

References

1. Brosens, I., Pijnenborg, R., Vercruyse, L., and Romero, R. (2011). The “great obstetrical syndromes” are associated with disorders of deep placentation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *204*, 193–201. 10.1016/j.ajog.2010.08.009.
2. Nardi, N., Brito-Zerón, P., Ramos-Casals, M., Aguiló, S., Cervera, R., Ingelmo, M., and Font, J. (2006). Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren’s syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients. *Clin. Rheumatol.* *25*, 341–346. 10.1007/s10067-005-0059-3.
3. Moise, K.J. (2008). Fetal anemia due to non-Rhesus-D red-cell alloimmunization. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* *13*, 207–214. 10.1016/j.siny.2008.02.007.
4. Burrows, R.F., and Kelton, J.G. (1993). Fetal thrombocytopenia and its relation to maternal thrombocytopenia. *N. Engl. J. Med.* *329*, 1463–1466. 10.1056/NEJM199311113292005.
5. Ellinger, I., Schwab, M., Stefanescu, A., Hunziker, W., and Fuchs, R. (1999). IgG transport across trophoblast-derived BeWo cells: a model system to study IgG transport in the placenta. *Eur. J. Immunol.* *29*, 733–744. 10.1002/(SICI)1521-4141(199903)29:03<733::AID-IMMU733>3.0.CO;2-C.
6. Antohe, F., Rădulescu, L., Gafencu, A., Gheție, V., and Simionescu, M. (2001). Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. *Hum. Immunol.* *62*, 93–105. 10.1016/s0198-8859(00)00244-5.
7. McCarthy, K.M., Yoong, Y., and Simister, N.E. (2000). Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: a system to study protein transport across epithelia. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 7)*, 1277–1285.
8. Ward, E.S., Martinez, C., Vaccaro, C., Zhou, J., Tang, Q., and Ober, R.J. (2005). From sorting endosomes to exocytosis: association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc receptor, FcRn, during recycling. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2028–2038. 10.1091/mbc.e04-08-0735.
9. Kohler, P.F., and Farr, R.S. (1966). Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport. *Nature* *210*, 1070–1071. 10.1038/2101070a0.
10. Malek, A., Sager, R., and Schneider, H. (1994). Maternal-fetal transport of immunoglobulin G and its subclasses during the third trimester of human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N* *1989* *32*, 8–14. 10.1111/j.1600-0897.1994.tb00873.x.
11. Halliday, R. (1955). Prenatal and postnatal transmission of passive immunity to young rats. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *144*, 427–430.
12. Appleby, P., and Catty, D. (1983). Transmission of immunoglobulin to foetal and neonatal mice. *J. Reprod. Immunol.* *5*, 203–213.
13. Jones, E.A., and Waldmann, T.A. (1972). The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J. Clin. Invest.* *51*, 2916–2927. 10.1172/JCI107116.
14. Cinicola, B., Conti, M.G., Terrin, G., Sgrulletti, M., Elfeky, R., Carsetti, R., Fernandez Salinas, A., Piano Mortari, E., Brindisi, G., De Curtis, M., et al. (2021). The Protective Role of Maternal Immunization in Early Life. *Front. Pediatr.* *9*.
15. Rottenstreich, A., Zarbiv, G., Oiknine-Djian, E., Zigron, R., Wolf, D.G., and Porat, S. (2021). Efficient Maternofetal Transplacental Transfer of Anti- Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike Antibodies After Antenatal SARS-CoV-2 BNT162b2 Messenger RNA Vaccination. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *73*, 1909–1912. 10.1093/cid/ciab266.

16. Grubb, J.H., Vogler, C., Tan, Y., Shah, G.N., MacRae, A.F., and Sly, W.S. (2008). Infused Fc-tagged beta-glucuronidase crosses the placenta and produces clearance of storage in utero in mucopolysaccharidosis VII mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8375–8380. 10.1073/pnas.0803715105.
17. Rueff-Juy, D., Faure, M., Drapier, A.-M., and Cazenave, P.-A. (1998). Role of Maternal Ig in the Induction of C κ -Specific CD8⁺ T Cell Tolerance. *J. Immunol.* *161*, 721–728.
18. Gupta, N., Culina, S., Meslier, Y., Dimitrov, J., Arnoult, C., Delignat, S., Gangadharan, B., Lecerf, M., Justesen, S., Gouilleux-Gruart, V., et al. (2015). Regulation of immune responses to protein therapeutics by transplacental induction of T cell tolerance. *Sci. Transl. Med.* *7*, 275ra21. 10.1126/scitranslmed.aaa1957.
19. Culina, S., Gupta, N., Boisgard, R., Afonso, G., Gagnerault, M.-C., Dimitrov, J., Østerbye, T., Justesen, S., Luce, S., Attias, M., et al. (2015). Materno-Fetal Transfer of Preproinsulin Through the Neonatal Fc Receptor Prevents Autoimmune Diabetes. *Diabetes* *64*, 3532–3542. 10.2337/db15-0024.
20. van den Brink, E.N., Turenhout, E.A., Bovenschen, N., Heijnen, B.G., Mertens, K., Peters, M., and Voorberg, J. (2001). Multiple VH genes are used to assemble human antibodies directed toward the A3-C1 domains of factor VIII. *Blood* *97*, 966–972. 10.1182/blood.v97.4.966.
21. Butenas, S., Parhami-Seren, B., Undas, A., Fass, D.N., and Mann, K.G. (2010). The “normal” factor VIII concentration in plasma. *Thromb. Res.* *126*, 119–123. 10.1016/j.thromres.2010.04.004.
22. Navarrete, A., Dasgupta, S., Delignat, S., Caligiuri, G., Christophe, O.D., Bayry, J., Nicoletti, A., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2009). Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH* *7*, 1816–1823. 10.1111/j.1538-7836.2009.03571.x.
23. NC3RS.org.
24. McIntosh, J., Lenting, P.J., Rosales, C., Lee, D., Rabbanian, S., Raj, D., Patel, N., Tuddenham, E.G.D., Christophe, O.D., McVey, J.H., et al. (2013). Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood* *121*, 3335–3344. 10.1182/blood-2012-10-462200.
25. Leebeek, F.W.G., Duvekot, J., and Kruip, M.J.H.A. (2020). How I manage pregnancy in carriers of hemophilia and patients with von Willebrand disease. *Blood* *136*, 2143–2150. 10.1182/blood.2019000964.
26. Jacquemin, M.G., Desqueper, B.G., Benhida, A., Vander Elst, L., Hoylaerts, M.F., Bakkus, M., Thielemans, K., Arnout, J., Peerlinck, K., Gilles, J.G., et al. (1998). Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood* *92*, 496–506.
27. Jacquemin, M., Gilles, J.G., and Saint-Remy, J.-M. (2010). Antibodies binding to the A2 domain of FVIII and inhibiting coagulation activity.
28. Bitonti, A.J., Dumont, J.A., Low, S.C., Peters, R.T., Kropp, K.E., Palombella, V.J., Stattel, J.M., Lu, Y., Tan, C.A., Song, J.J., et al. (2004). Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9763–9768. 10.1073/pnas.0403235101.
29. Lieu, K. (2017). Many factor VIII products available in the treatment of hemophilia A: an embarrassment of riches? *J. Blood Med.* *8*, 67–73. 10.2147/JBM.S103796.
30. Saxena, R., and Ranjan, R. (2014). Prenatal Diagnosis of Hemophilia A and B. *J Mol Biol Mol Imaging Volume 1*, *7*.

31. den Uijl, I.E.M., Fischer, K., Van Der Bom, J.G., Grobbee, D.E., Rosendaal, F.R., and Plug, I. (2011). Analysis of low frequency bleeding data: the association of joint bleeds according to baseline FVIII activity levels. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* *17*, 41–44. 10.1111/j.1365-2516.2010.02383.x.
32. Singleton, T.C., and Keane, M. (2012). Diagnostic and therapeutic challenges of intracranial hemorrhage in neonates with congenital hemophilia: a case report and review. *Ochsner J.* *12*, 249–253.
33. Lenting, P.J., VAN Schooten, C.J.M., and Denis, C.V. (2007). Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J. Thromb. Haemost. JTH* *5*, 1353–1360. 10.1111/j.1538-7836.2007.02572.x.
34. Chiu, P.-L., Bou-Assaf, G.M., Chhabra, E.S., Chambers, M.G., Peters, R.T., Kulman, J.D., and Walz, T. (2015). Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood* *126*, 935–938. 10.1182/blood-2015-04-641688.
35. Lenting, P.J., Neels, J.G., van den Berg, B.M., Clijsters, P.P., Meijerman, D.W., Pannekoek, H., van Mourik, J.A., Mertens, K., and van Zonneveld, A.J. (1999). The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* *274*, 23734–23739. 10.1074/jbc.274.34.23734.
36. Wassef, L., Shete, V., Hong, A., Spiegler, E., and Quadro, L. (2012). β -Carotene supplementation decreases placental transcription of LDL receptor-related protein 1 in wild-type mice and stimulates placental β -carotene uptake in marginally vitamin A-deficient mice. *J. Nutr.* *142*, 1456–1462. 10.3945/jn.112.162677.
37. Cao, C., Pressman, E.K., Cooper, E.M., Guillet, R., Westerman, M., and O'Brien, K.O. (2014). Placental heme receptor LRP1 correlates with the heme exporter FLVCR1 and neonatal iron status. *Reprod. Camb. Engl.* *148*, 295–302. 10.1530/REP-14-0053.
38. Ali, S.R., Fong, J.J., Carlin, A.F., Busch, T.D., Linden, R., Angata, T., Areschoug, T., Parast, M., Varki, N., Murray, J., et al. (2014). Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B *Streptococcus*. *J. Exp. Med.* *211*, 1231–1242. 10.1084/jem.20131853.
39. Wroblewska, A., van Haren, S.D., Herczenik, E., Kaijen, P., Ruminska, A., Jin, S.-Y., Zheng, X.L., van den Biggelaar, M., ten Brinke, A., Meijer, A.B., et al. (2012). Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. *Blood* *119*, 5294–5300. 10.1182/blood-2011-11-391680.
40. Gangadharan, B., Ing, M., Delignat, S., Peyron, I., Teyssandier, M., Kaveri, S.V., and Lacroix-Desmazes, S. (2017). The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells. *Haematologica* *102*, 271–281. 10.3324/haematol.2016.148502.
41. Sekar, R., Proulle, V., Loyau, S., Delignat, S., Boulaftali, Y., Mimoun, A., Jandrot-Perrus, M., and Lacroix-Desmazes, S. (2019). GPVI is a binding partner for pro-coagulant factor VIII on platelets. *ECTH-128*.
42. Seth Chhabra, E., Liu, T., Kulman, J., Patarroyo-White, S., Yang, B., Lu, Q., Drager, D., Moore, N., Liu, J., Holthaus, A.M., et al. (2020). BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice. *Blood* *135*, 1484–1496. 10.1182/blood.2019001292.
43. Fuller, J.R., Knockenhauer, K.E., Leksa, N.C., Peters, R.T., and Batchelor, J.D. (2021). Molecular determinants of the factor VIII/von Willebrand factor complex revealed by BIVV001 cryo-electron microscopy. *Blood* *137*, 2970–2980. 10.1182/blood.2020009197.
44. Bovenschen, N., Rijken, D.C., Havekes, L.M., van Vlijmen, B.J.M., and Mertens, K. (2005). The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein

- receptor. *J. Thromb. Haemost. JTH* 3, 1257–1265. 10.1111/j.1538-7836.2005.01389.x.
45. Spiegel, P.C., Jacquemin, M., Saint-Remy, J.-M.R., Stoddard, B.L., and Pratt, K.P. (2001). Structure of a factor VIII C2 domain–immunoglobulin G4κ Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. *Blood* 98, 13–19. 10.1182/blood.V98.1.13.
 46. Laroche, A., Orsini Delgado, M.L., Chalopin, B., Cuniasse, P., Dubois, S., Sierocki, R., Gallais, F., Debroas, S., Bellanger, L., Simon, S., et al. (2022). Deep mutational engineering of broadly-neutralizing nanobodies accommodating SARS-CoV-1 and 2 antigenic drift. *mAbs* 14, 2076775. 10.1080/19420862.2022.2076775.
 47. Mancardi, D.A., Iannascoli, B., Hoos, S., England, P., Daëron, M., and Bruhns, P. (2008). FcγRIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J. Clin. Invest.* 118, 3738–3750. 10.1172/JCI36452.
 48. Dimitrov, J.D., Roumenina, L.T., Plantier, J.-L., Andre, S., Saboulard, D., Meslier, Y., Planchais, C., Jacquemin, M., Saint-Remy, J.-M., Atanasov, B.P., et al. (2010). A human FVIII inhibitor modulates FVIII surface electrostatics at a VWF-binding site distant from its epitope. *J. Thromb. Haemost. JTH* 8, 1524–1531. 10.1111/j.1538-7836.2010.03878.x.
 49. Jacquemin, M., Benhida, A., Peerlinck, K., Desqueper, B., Vander Elst, L., Lavend’homme, R., d’Oiron, R., Schwaab, R., Bakkus, M., Thielemans, K., et al. (2000). A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood* 95, 156–163.

Tables

Table 1. Kinetic parameters that govern the binding of FabFc to the mouse FcRn

Binding to mFcRn	k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)	Chi²
KM33 FabFc	4.5 x 10 ⁵	4.32 x 10 ⁻⁴	0.96	1.55
KM33 FabFc^{HHH}	ND	ND	ND	-
KM33 FabFc^{N297A}	4.59 x 10 ⁵	3.83 x 10 ⁻⁴	1.2	3.75

The binding kinetics of the different FabFc variants were studied by surface plasmon resonance at pH 6 with association times of 4 min and dissociation times of 5 min for FabFc concentration ranging from 0.04 to 25 nM. Biotinylated mouse FcRn was immobilized on streptavidin-coated chips at 500 RU. ND: no detectable signal.

Legends to figures

Figure 1. Transplacental delivery of exogenous FVIII is mediated by KM33 FabFc

Panel A. The KM33 FabFc includes variable heavy (VH) and light (VL) chains of the human anti-FVIII IgG KM33 and the constant regions of the human IgG1 and of the kappa light chain. The Fc fragment is stabilized by addition of a linker. Panel B. Binding of KM33 FabFc to FVIII. KM33 FabFc and IgG were incubated in serial dilutions on plates coated with human full-length FVIII (Advate®). The graph depicts the binding of the FabFc and IgG detected using a secondary anti-human Fc IgG. Binding is expressed as arbitrary units (AU) as mean±standard deviation (SD) based on the optical density measured at 492 nm, in three independent experiments. Panel C. Inhibition of the binding of FVIII to VWF by KM33 FabFc. KM33 FabFc and IgG were incubated with full-length FVIII (0.2 nM, Advate®), prior to incubation on VWF (10 µg/ml, Wilfactin®)-coated ELISA plates. FVIII binding was detected using a mouse anti-A2 domain IgG and is expressed as the percentage of inhibition of the binding of FVIII incubated alone (n=3, mean±SD). Panel D. KM33 FabFc-mediated FVIII transplacental delivery. Naïve pregnant FVIII-KO mice (n=3-5) at E17.5 of gestation were injected intravenously with FVIII alone (50 µg) or FVIII pre-incubated with KM33 FabFc, KM33 FabFc^{N297A} or KM33 FabFc^{IHH} (30 µg). Blood was collected from the fetuses 4 hours after injection of the mothers. FVIII (left panel), the FVIII/KM33 FabFc complex (middle panel) and KM33 FabFc (right panel) were then quantified in the fetuses' plasma using three different ELISA setups. The graphs depict the molar concentrations of the different molecules. Each individual dot represents a pool of 2 to 3 fetuses' plasma. The horizontal dotted line represents the threshold of FVIII, complex or FabFc detection (0.003, 0.003 and 0.005 nM, respectively). Differences were statistically assessed using the two-tailed non-parametric Mann-Whitney test. Horizontal lines depict the means.

Figure 2. *In vivo* stability of the FVIII/FabFc complex

KM33 FabFc alone (29.1 µg), FVIII alone (50 µg) or pre-incubated with KM33 FabFc (29.1 µg), and rFVIII-Fc (50 µg) were injected intravenously to naïve E17.5 pregnant FVIII-KO mice (n=3-5). **Panel A.** Kinetics of elimination of FVIII and KM33 FabFc in the mothers' circulation. Blood was collected from the pregnant mice 5 min and 4 hours after injection of the molecules. The graph depicts the concentration of FVIII and KM33 FabFc quantitated independently by ELISA, as already described (mean±SD). **Panel B.** FVIII/FabFc molar ratios in mothers' and fetuses' plasma. The concentration of FVIII and KM33 FabFc were also quantitated independently in the plasma of the fetuses 4 hours following injection of the mothers. Each dot represents the plasma pool from 2-3 fetuses. **Panels C and D.** Detection of FVIII in different organs. Mice were injected with FVIII (50 µg) alone or pre-incubated with equimolar amounts (29.1 µg) of KM33 FabFc or KM33 FabFc^{IHH}. Livers and spleens were collected 30 min later (Panel C) and placentas were collected 4 hours later (Panel D). Immunofluorescence on tissue sections was performed to detect FVIII, FabFc and/or syncytiotrophoblasts using a polyclonal sheep anti-human FVIII IgG (red, left panels on C and D), a goat anti-human Ig Fab (green, middle panels on C) and a rat anti-mouse Ly-6A/E antibody (green, middle panels on D), respectively. Nuclei were stained using Hoechst (blue). Images were acquired using a confocal microscope (63X) Zeiss LSM 710 and merged (right panels). The percentages of co-localization between FVIII and KM33 FabFc (panel C), or between FVIII and Ly6E (panel D and **Fig. S2**) are depicted on the right of each panel (n=10, mean±SD). **Panel E.** pH sensitivity of the interaction between FVIII and KM33 FabFc. KM33 FabFc (13 nM) was diluted in buffers with pH ranging from 3 to 8, prior to incubation on FVIII (2.5 µg/ml, Advate®)-coated ELISA plates. The residual binding is depicted in arbitrary units (optical density measured at 492 nm) (mean±SD of 2 independent experiments). **Panel F.**

Transplacental delivery of rFVIII^{Fc}. The amounts of rFVIII^{Fc} were measured by ELISA in the fetuses' plasma 4 hours following injection to E17.5 pregnant mice, as explained. Each dot represents plasma pool from 2-3 fetuses. The red dots represent the amount of FVIII transplacentally delivered by KM33 Fab^{Fc} and are from Fig. 1D. Differences were statistically assessed using the two-tailed non-parametric Mann-Whitney test. Horizontal lines depict the means (ns: non-significant).

Figure 3. Transplacental delivery of endogenous FVIII

Panel A. Kinetics of FVIII expression following gene therapy. Six-week old female FVIII-KO mice were administered intravenously with 2×10^{13} vg/kg of rAAV-HLP-codop-hFVIII-V3. FVIII antigen in plasma was measured by ELISA and is expressed in nM (horizontal bars depict means). Each dot represents one single mouse. **Panel B.** Endogenous FVIII levels in pregnant mice at the time of transplacental delivery experiments. FVIII-producing pregnant mice were injected with KM33 Fab^{Fc} (0.15, 1.5 μ g or 4 μ g in 200 μ L) or KM33 Fab^{Fc}^{IHH} (4 μ g in 200 μ L) at E17.5 (i.e., 4-18 weeks after gene therapy). FVIII was measured by ELISA in mothers' plasma 5 min later. **Panels C and D.** FVIII and Fab^{Fc} transplacental delivery. The levels of transplacentally delivered KM33 Fab^{Fc} (panel C) and FVIII (panel D) were measured in fetuses' plasma 4 hours following Fab^{Fc} injection to pregnant mice. Each single dot is representative of a plasma pooled from 2 or 3 fetuses. The horizontal dotted lines represent the threshold of FVIII or Fab^{Fc} detection (0.003 and 0.005 nM, respectively). Differences were statistically assessed using a two-tailed non-parametric Mann-Whitney test. Horizontal lines depict the means.

Figure 4. Effect of antigen size and epitope specificity of Fab^{Fc} on transplacental delivery efficiency

Panels A and B. Transplacental delivery of exogenous FVIII by FabFc with different epitope specificities. FVIII was pre-incubated with the A2 domain-specific BOIIB2 FabFc or C2 domain-specific BO2C11 FabFc prior to injection to naïve E17.5 pregnant FVIII-KO mice (n=3-4). Blood was collected from the fetuses 4 hours after injection of the mothers. FVIII (panel A) and FabFc (not shown) were quantified in the fetuses' plasma by ELISA. Panel A depicts the FVIII concentration with each individual dot representing a pool of 2 or 3 fetuses' plasma. The horizontal dotted line represents the threshold of FVIII detection. Panel B depicts the FVIII/FabFc molar ratio at 4 hours in the fetuses' plasma. Data shown for KM33 FabFc in panel A and B are from Fig. 1D and Fig. 2B, respectively. Panel C. Impact of the size on the transplacental delivery. KM33 FabFc and BO2C11 FabFc (25 µg or 29.1 µg) were incubated at equimolar concentrations with full-length FVIII (70µg) (FL, Helixate®) or with BDD FVIII (50µg, 150 nM) (BDD). BO2C11 FabFc (29 µg, 145 nM) was also incubated at equimolar concentrations with the recombinant FVIII C2 domain (5.5 µg, 145 nM). The molecular complexes were then injected to E17.5 pregnant FVIII-KO mice. FVIII or C2 concentrations were measured in the fetuses' plasma 4 hours later using dedicated ELISAs and are depicted on the graph. Each dot represents a pool of 2 to 3 fetuses' plasma. Data for transplacental delivery of BDD FVIII by KM33 and BO2C11 FabFc are from Fig. 1D and panel A. Panel D. Effect of VWF on the transplacental delivery of FVIII. FVIII was pre-incubated with BOIIB2 FabFc prior to injection to E17.5 pregnant FVIII-KO or double FVIII/VWF-KO mice (n=2-4). FVIII concentration was detected in the fetuses' plasma 4 hours later with each dot representing the plasma pool from 2-3 fetuses. Data for transplacental delivery of FVIII by BOIIB2 FabFc in FVIII-KO mice are from panel A. Statistical differences were determined using the two-tailed non-parametric Mann-Whitney test (ns: non-significant). Horizontal lines depict the means.

Figure 1

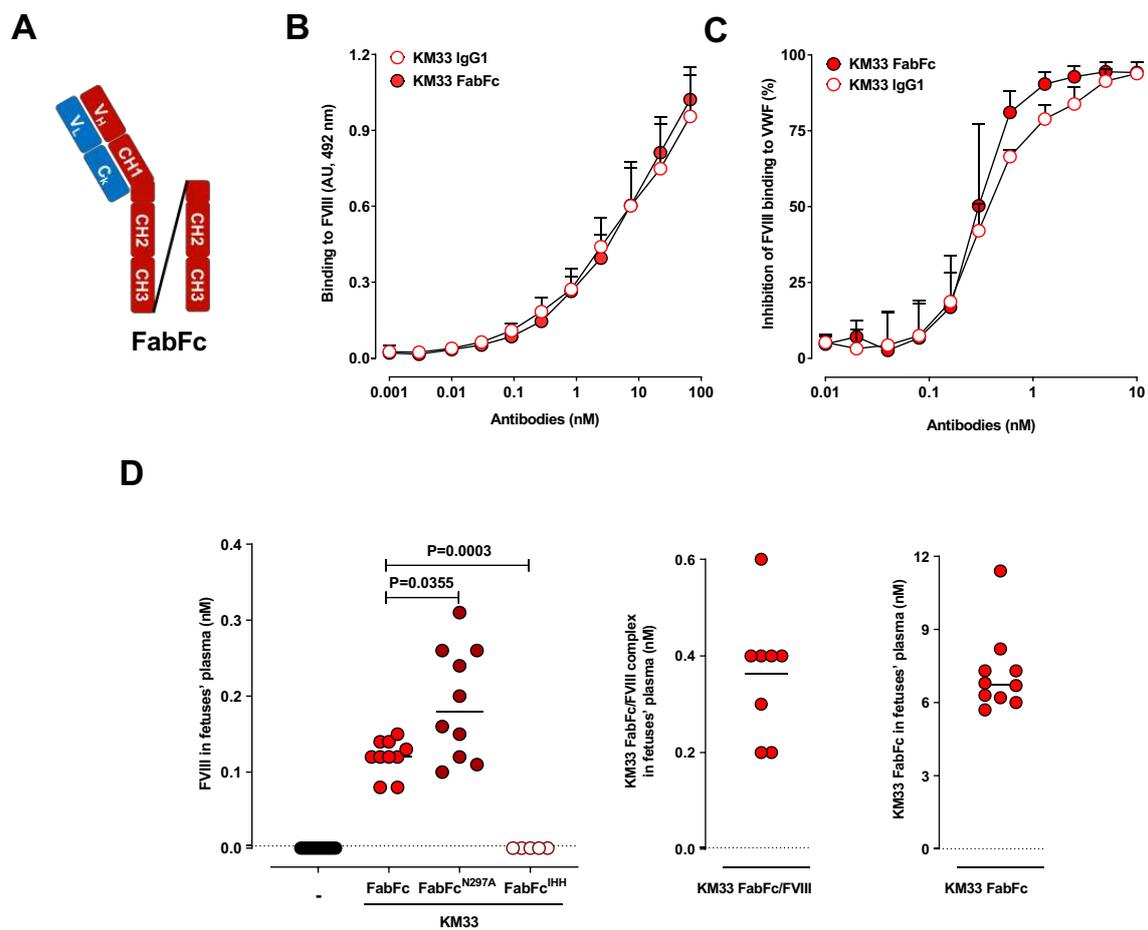


Figure 2

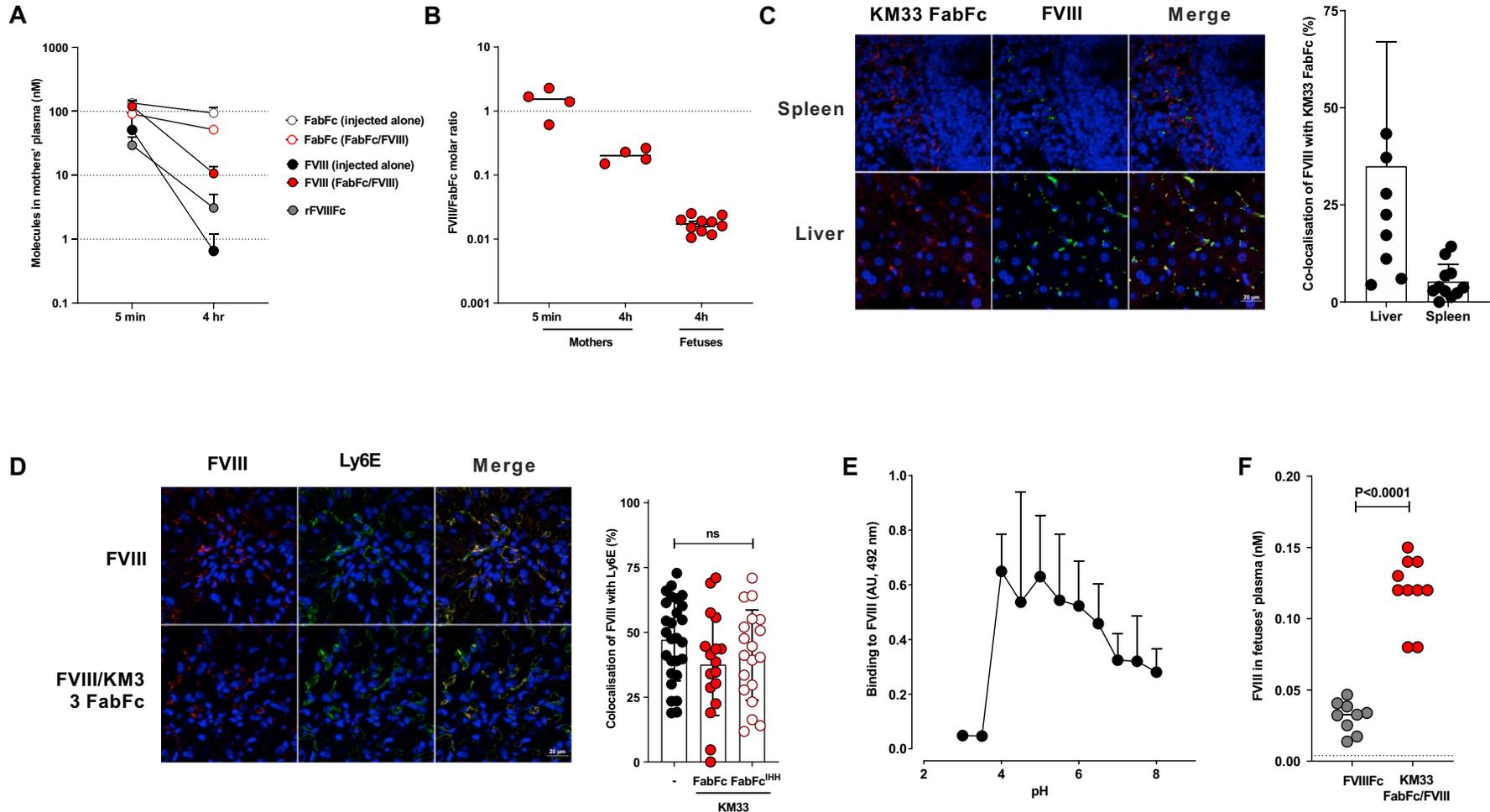


Figure 3

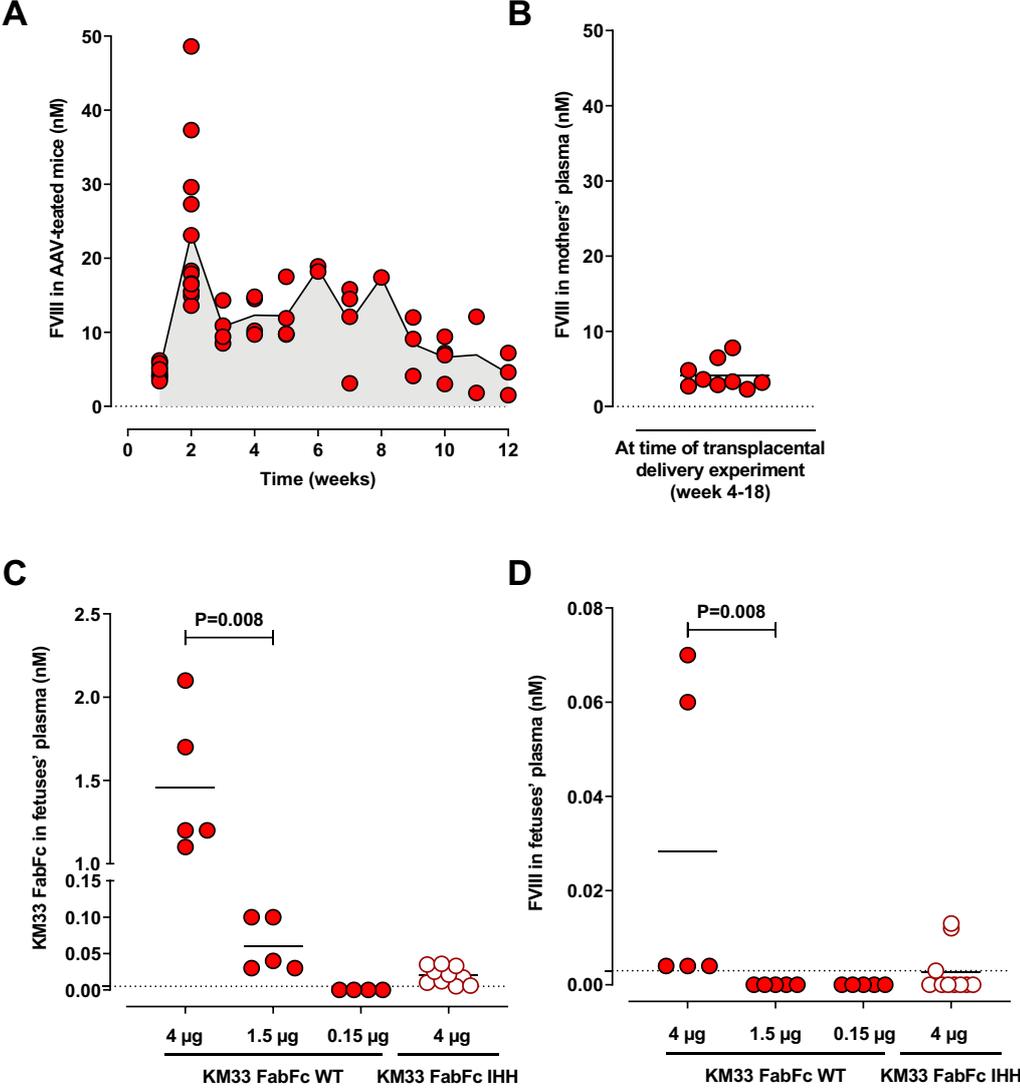
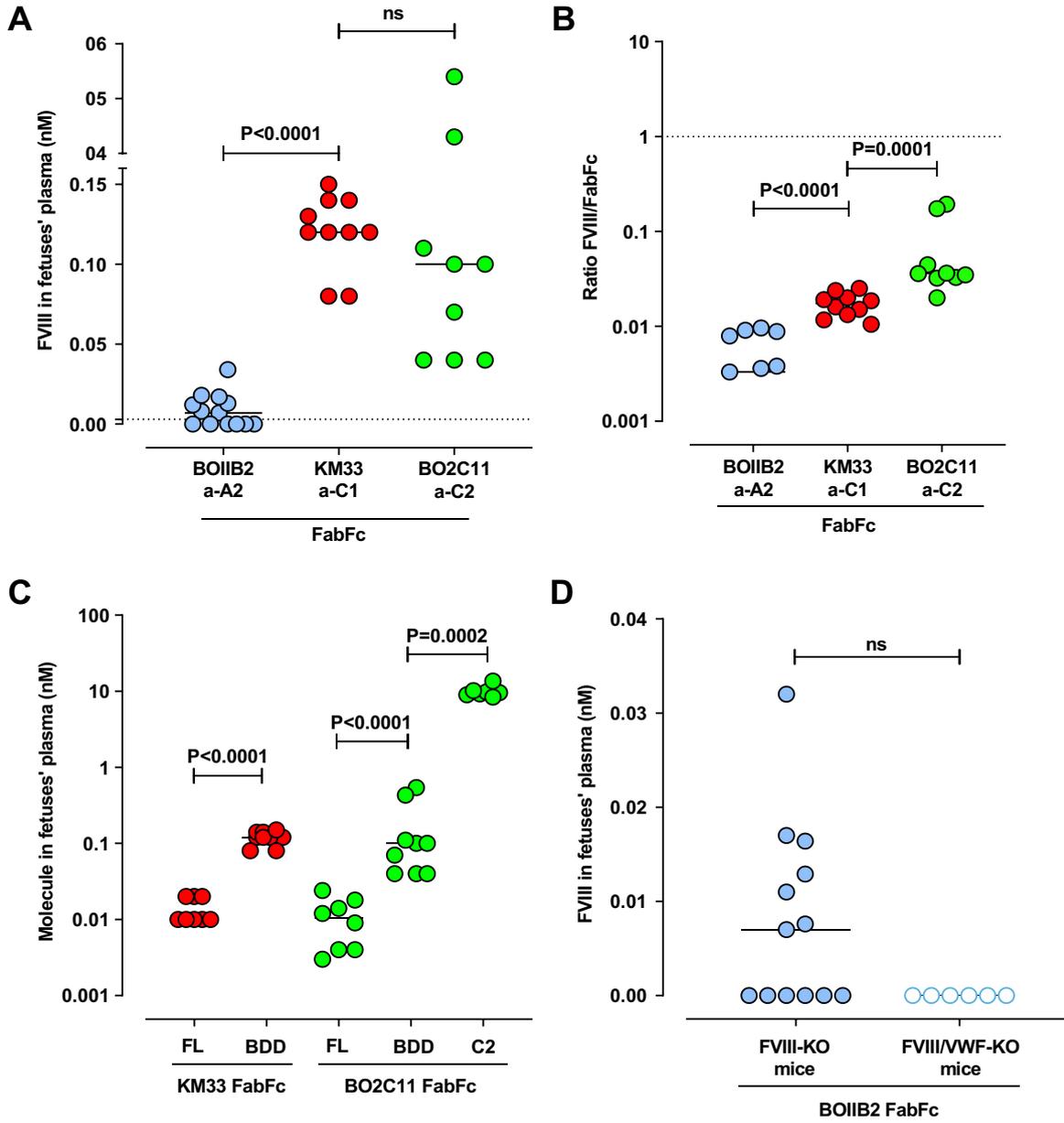


Figure 4



Supplementary methods

Inhibition of the functional activity of FVIII. The neutralizing activity of anti-FVIII FabFc and IgG was measured in a modified Bethesda assay.^{1,2} Serial dilutions of FabFc and IgG starting from 16.7 nM were incubated in standard human plasma as a source of FVIII (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) for 2 hours at 37°C. The residual FVIII levels were measured in a FVIII chromogenic kit (Siemens Healthcare). Briefly, samples were incubated with activated coagulation factor IX and factor X for 3 minutes, followed by the addition of a chromogenic substrate for activated factor X for 20 minutes. The optical density was measured at 405 nm. The inhibitory activity is expressed in Bethesda units (BU) per µg of protein, which corresponds to the inverse of the protein amount that yields to 50% FVIII inhibition.

References

1. Kasper, C.K., Aledort, L., Aronson, D., Counts, R., Edson, J.R., van Eys, J., Fratantoni, J., Green, D., Hampton, J., Hilgartner, M., et al. (1975). Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34, 612.
2. Verbruggen, B., Novakova, I., Wessels, H., Boezeman, J., van den Berg, M., and Mauser-Bunschoten, E. (1995). The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb. Haemost.* 73, 247–251.

Supplementary Tables

Table S1. Inhibitory activity of the anti-FVIII IgG and FabFc towards pro-coagulant FVIII

	BU/ μ g	
	IgG1	FabFc
BOIIB2	6.1 \pm 0.7	7.4 \pm 2.7
KM33	0.9 \pm 0.3	1.4 \pm 0.4
BO2C11	7.1 \pm 1.0	2.8 \pm 0.4

The FVIII neutralizing activity of the parent human IgG and corresponding engineered FabFc were measured in an in vitro functional pro-coagulant Bethesda assay. BU: Bethesda units.

Table S2. Kinetic parameters that govern the binding of FabFc to the mouse FcRn

Binding to mFcRn	k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)	χ^2
BO2C11 FabFc	1.8×10^5	2.8×10^{-4}	1.5	2.8
BOIIB2 FabFc	1.7×10^5	4.7×10^{-4}	2.7	3.3

The binding kinetics of the different FabFc variants were studied by surface plasmon resonance at pH 6 with association times of 4 min and dissociation times of 5 min for FabFc concentration ranging from 0.04 to 25 nM. Biotinylated mouse FcRn was immobilized on streptavidin-coated chips at 500 RU. ND: no detectable signal.

Supplementary figures

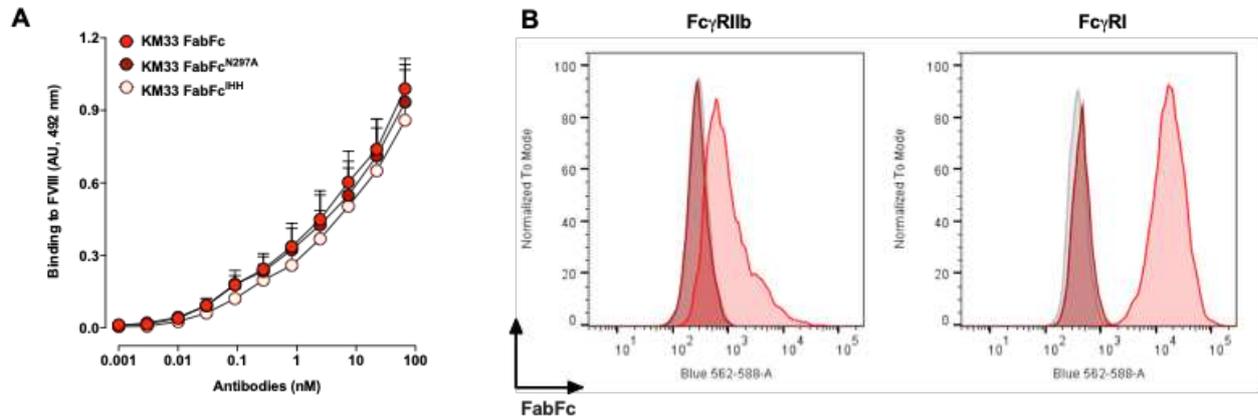


Figure S1. Validation of KM33 FabFc, KM33 FabFc^{N297A}, and KM33 FabFc^{IHH}. Panel A. Binding of KM33 FabFc, KM33 FabFc^{N297A} and KM33 FabFc^{IHH} to FVIII. The different FabFc were incubated in serial dilutions on plates coated with human full-length FVIII (Advate®). The graph depicts the binding of the FabFc detected using a secondary anti-human Fc IgG, expressed in arbitrary units (AU) as mean \pm SD, based on the optical density measured at 492 nm in three independent experiments. Panel B. Binding of KM33 FabFc and KM33 FabFc^{N297A} to murine FcγRs. The FabFc (10 nM) were incubated with CHO cells expressing the mouse FcγRI (CD64) or FcγRIIb (CD32b). Bound FabFc were detected with a goat anti-human IgG F(ab')₂ conjugated to PE. The fluorescence was measured by flow cytometry (BD LSR 2). The histograms show the binding of KM33 FabFc in red, KM33 FabFc^{N297A} in dark red and cells incubated alone in grey. Data are representative of 3 independent experiments.

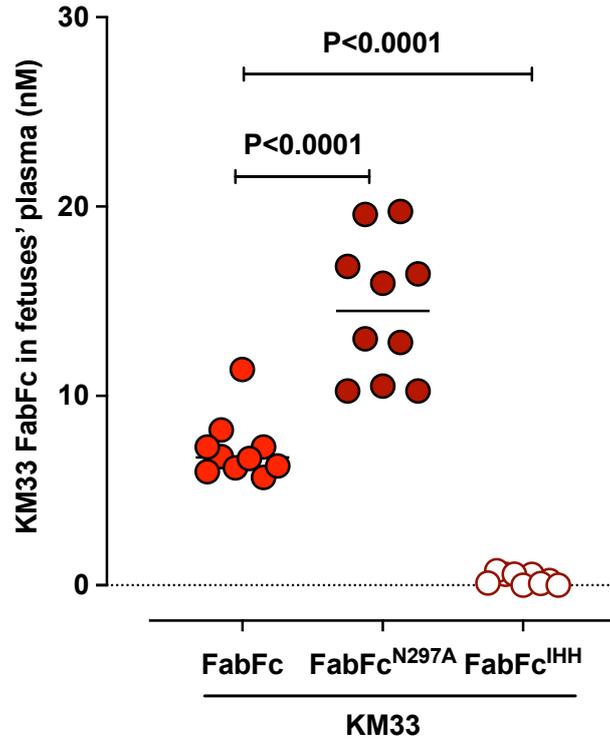


Figure S2. Transplacental delivery of KM33 FabFc. Naïve pregnant FVIII-KO mice (n=3-4) at E17.5 of gestation were injected intravenously with FVIII (50 µg) pre-incubated with KM33 FabFc, KM33 FabFc^{N297A} or KM33 FabFc^{IHH} (29.1 µg). Blood was collected from the fetuses 4 hours after injection of the mothers. The different KM33 FabFc variants were then quantified in the fetuses' plasma by ELISA. The graphs depict the molar concentrations of the different FabFc. Each individual dot represents a pool of 2 to 3 fetuses' plasma. The horizontal dotted line represents the threshold of FabFc detection (0.005 nM). Differences were statistically assessed using the two-tailed non-parametric Mann-Whitney test. Horizontal lines depict the means.

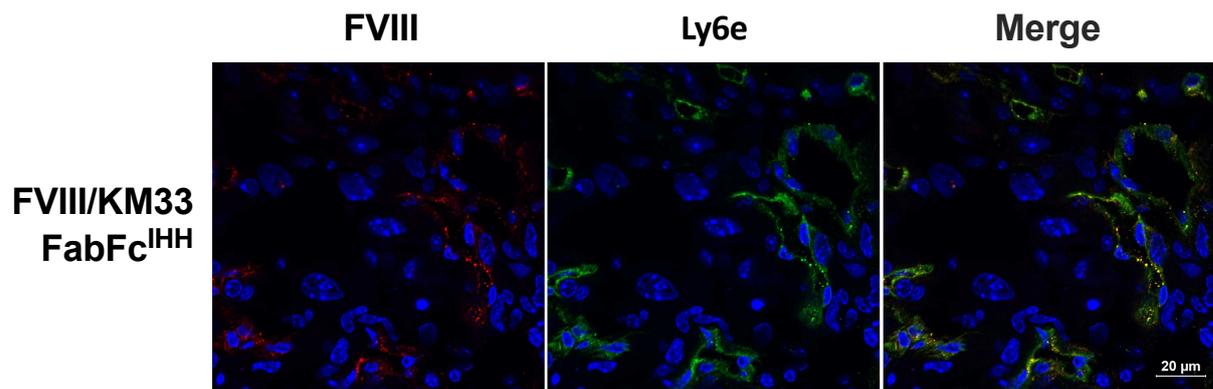


Fig S3. Accumulation of FVIII in the placenta. Mice were injected with FVIII (50 μ g) pre-incubated with equimolar amounts (29.1 μ g) of KM33 FabFc^{IHH}. Placentas were collected 4 hours later. Immunofluorescence on placenta sections was performed to detect FVIII or syncytiotrophoblasts using a polyclonal sheep anti-human FVIII IgG (red, left panel), and a rat anti-Ly-6A/E antibody (green, middle panel). Nuclei were stained using Hoechst (blue). Images were acquired using a confocal microscope (63X) Zeiss LSM 710 and merged (right panels).

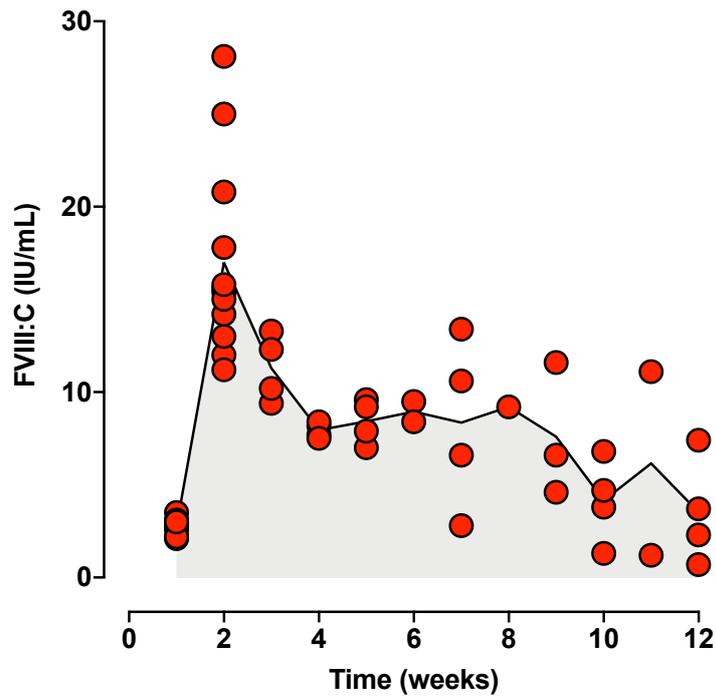


Figure S4. Kinetics of FVIII expression following gene therapy. Six-week old female FVIII-KO mice were administered intravenously with 2×10^{13} vg/kg of rAAV-HLP-codop-hFVIII-V3. FVIII activity (FVIII:C) in plasma was measured using a chromogenic assay and is expressed in IU/ml. Each dot represents one single mouse. The curve connecting mean values is shown as a plain line.

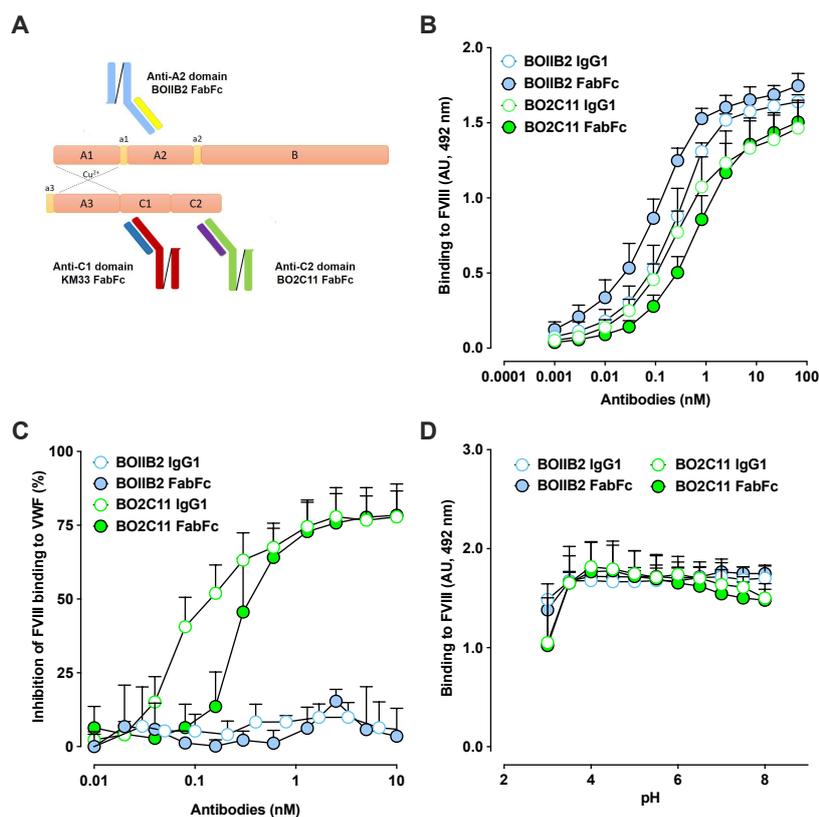


Figure S5. Validation of anti-FVIII FabFc. Panel A. Structure and specificity of FabFc. The 3 FabFc includes variable heavy (VH) and light (VL) chains of the A2-specific BOIIB2, C1-specific KM33 or C2-specific BO2C11 human anti-FVIII IgG1, as well as the constant regions from the human IgG1 and from the human kappa light chain. The Fc fragments are stabilized by addition of a linker. The panel also depicts the heterodimeric structure of human procoagulant FVIII with the heavy chain (A1-A2-B domains) and light chain (A3-C1-C2 domains). Panel B. Binding of BOIIB2 and BO2C11 FabFc to FVIII. FabFc and IgG were incubated in serial dilutions on FVIII (Advate®)-coated plates. The graph depicts the binding of the FabFc and IgG detected using a secondary anti-human Fc IgG. Binding is expressed as arbitrary units (AU) as mean±SD based on the optical density measured at 492 nm, in three independent experiments. Panel C. Inhibition of the binding of FVIII to VWF by BOIIB2 and BO2C11 FabFc. FabFc and IgG were incubated with full-length FVIII (0.2 nM, Advate®), prior to incubation on VWF (10 µg/ml, Wilfactin®)-coated ELISA plates. FVIII binding was detected using a mouse anti-A2 domain IgG and is expressed as the percentage of inhibition of the binding of FVIII incubated alone (n=3, mean±SD). Panel D. pH sensitivity of the interaction between FVIII and BOIIB2 and BO2C11 FabFc. FabFc (13 nM) were diluted in buffers with pH ranging from 3 to 8, prior to incubation on FVIII (2.5 µg/ml, Advate®)-coated ELISA plates. The residual binding is depicted in arbitrary units (optical density measured at 492 nm) (mean±SD of 2 independent experiments).

II - Induction de tolérance envers le FVIII thérapeutique

II - 1- Introduction

L'hémophilie A étant une maladie handicapante et coûteuse, des mutations sur le gène F8 sont recherchées lors de l'amniocentèse lorsque les femmes sont conductrices de la maladie afin de leur permettre de faire une interruption de grossesse volontaire, si elles le souhaitent. Ce test se fait en général entre la 15^{ème} et la 18^{ème} semaine de gestation. Nous savons donc avant la naissance si l'enfant sera hémophile A ou non (Saxena & Ranjan 2014).

La tolérance aux protéines du soi, et plus généralement le système immunitaire, commence à se mettre en place pendant le stade fœtal. Chez l'Homme, bien que le réarrangement du TCR et les sélections positive et négative des clones T soient détectées dès la 6^{ème} semaine de grossesse dans le foie fœtal, les cellules souches hématopoïétiques ne colonisent le thymus qu'à partir de la 8^{ème} semaine de grossesse (Mimoun et al. 2020). Par ailleurs, les cellules T régulatrices CD4⁺, CD25⁺ et FoxP3⁺ sont détectées dès la 13^{ème} semaine de grossesse (Darrasse-Jèze et al. 2005). Chez la souris, le thymus est formé à E9, néanmoins la colonisation par les cellules souches hématopoïétiques ne débute qu'entre E10.5 et E13, et le réarrangement du TCR, les sélections positive et négative des clones T, ainsi que le développement de cellules T régulatrices ne sont détectés qu'à partir de E14 et ce jusqu'à la fin de la gestation (Mimoun et al. 2020). Comme mentionné précédemment, le transfert transplacentaire d'IgGs maternelles débute à la seconde moitié du second semestre de grossesse chez l'humain (Malek et al. 1996), et à E15 chez la souris (Appleby & Catty 1983). La fenêtre la plus avantageuse pour à la fois favoriser le transfert transplacentaire de molécules thérapeutiques, et induire une tolérance est donc chez la souris, de E14 jusqu'à la fin de la grossesse.

Le transfert transplacentaire d'IgG par le FcRn peut être exploité pour moduler les répertoires immunitaires de la descendance. Les IgGs maternelles peuvent naturellement influencer les réponses T fœtales vers une réponse pro-toléro-gène. Par le transfert transplacentaire (et transépithélial), d'immunoglobulines kappa chez une descendance déficiente en chaîne kappa (C κ), D. Rueff-Juy a démontré l'induction d'une tolérance spécifique pour la chaîne kappa. Cette induction de tolérance reposait sur la suppression des LT CD8⁺ C κ -spécifiques par des LT CD4⁺ (Rueff-Juy et al. 1998). Dans le cas de la réponse immunitaire anti-FVIII, nous avons démontré que le transfert transplacentaire (et

transépithélial) d'IgGs maternelles anti-FVIII protégeait la descendance contre le développement d'inhibiteurs probablement par la modulation des répertoires T (Meslier et al. 2010).

Nous avons également démontré, en collaboration avec un autre laboratoire, que le transfert transplacentaire de protéines fusionnées au Fc γ 1 murine pouvait moduler le système immunitaire fœtal. La transcytose de ces protéines à l'âge fœtal, permettait la génération de cellules T régulatrices spécifiques qui protégeaient la descendance contre le développement d'une réponse immunitaire après un challenge avec l'antigène (Gupta et al. 2015), ou contre le développement d'auto-immunité (Culina et al. 2015).

J'ai pour ma part validé le transfert transplacentaire du FVIII exogène et endogène à l'aide d'IgG1 monovalentes humaines spécifiques du FVIII, chez deux modèles pré-cliniques d'hémophilie A.

A l'aide de ces deux modèles pré-cliniques, j'ai démontré que le transfert transplacentaire était hautement dépendant de la taille de la protéine transférée, et j'ai identifié les épitopes défavorisant ce transfert transplacentaire.

Mon objectif ici, était de déterminer si l'introduction chez le fœtus du FVIII par les FabFcs, permettait l'induction de tolérance envers cet protéine.

Pour cela, j'ai traité : i) des souris FVIII-KO avec du FVIII pré-incubé avec KM33 FabFc à E16, E17 et E18, ou ii) des souris FVIII-KO exprimant du FVIII après injection d'AAV-FVIII avec KM33 FabFc seul à E15. La descendance de ces souris a été traitée avec du FVIII thérapeutique pendant 6 semaines et j'ai analysé le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII au sein de ces individus.

II - 2 - Méthodes

Souris

Des souris déficientes en FVIII (FVIII exon 16 KO, FVIII-KO), ainsi que des souris SUREL1 transgéniques HLA-A2.1-/HLA-DR1, H-2 classe I-/classe II KO, âgées de six à douze semaines ont été utilisées pour réaliser les expériences. Les animaux ont été manipulés en accord avec les autorités éthiques locales (approbation obtenue par le comité éthique Charles Darwin, autorisations APAFIS#8219-2016121917406953 v3 et APAFIS#30960-2021070116253589 v4).

Induction de tolérance immunitaire par le transfert transplacentaire de FVIII

Pour déterminer si l'introduction de FVIII dans la circulation foetale permet l'induction d'une tolérance spécifique envers le FVIII thérapeutique, un modèle de souris FVIII-KO et un modèle de souris exprimant le FVIII humain après traitement avec des AAV8 FVIII-V3 (2×10^{13} vg/kg) (McIntosh et al. 2013) contenant un FVIII BDD codon optimisé (présenté dans la première partie des Résultats) ont été utilisées. Les souris FVIII-KO naïves ont été traitées à E16.5, E17.5 et E18.5 (dans la veine rétro-orbitale) avec 50 µg de FVIII délété de son domaine B (BDD, NovoEight®, Novo Nordisk) pré-incubé pendant 30 min à 4°C avec 30 µg de KM33 FabFc ou de KM33 FabFc^{IHH} dans 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂ pH7.4. Les souris exprimant de manière endogène le FVIII BDD humain ont été traitées avec 90 µg de KM33 FabFc ou KM33 FabFc^{IHH} à E15.5. Les mères ont donné naissance aux bébés et nous avons laissé la descendance avec leurs mères respectives pendant trois semaines, jusqu'au temps du sevrage. A partir de l'âge de 6 semaines, les souriceaux ont été traités une fois par semaine pendant 6 semaines avec 0,5 µg de FVIII BDD (NovoEight®) dilué en 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂ pH7.4 (injection rétro-orbitale, 100 µL). Les souriceaux ont été prélevés dans la veine rétro-orbitale à l'aide de capillaires héparinés (Hirschmann), une semaine avant la première immunisation puis une fois par semaine à partir de la 3^{ème} semaine de traitement.

Analyse de la réponse immunitaire anti-FVIII après induction de tolérance

Nous avons réalisé des ELISA afin de déterminer si la descendance des femelles traitées avec KM33 FabFc et KM33 FabFc^{IHH} développait une réponse immunitaire anti-FVIII. La capture des IgGs de souris anti-FVIII a été réalisée en recouvrant des plaques ELISA avec du FVIII entier (Advate®, Takeda) à 2 µg/mL. Après l'incubation des sérums de souris, la présence d'IgGs de

souris anti-FVIII a été révélée à l'aide d'un anticorps de chèvre dirigé contre les IgGs de souris conjugué à l'HRP (1030-05, Southern Biotech). La densité optique a été mesurée à 492 nm après l'ajout du substrat OPD (Sigma Aldrich).

Analyse du titre inhibiteur après induction de tolérance

Les titres d'anticorps inhibiteurs ont été quantifiés chez la descendance des femelles traitées avec KM33 FabFc et KM33 FabFc^{IHH} par un test de Bethesda modifié (Kasper et al. 1975; Verbruggen et al. 1995). Des dilutions en série de sérums de souris ont été incubées dans du plasma humain standard contenant du FVIII humain (Siemens Healthcare) pendant 2 heures à 37°C. L'activité résiduelle du FVIII présent dans le plasma standard a été mesurée à l'aide d'un kit chromogénique (Siemens Healthcare). Brièvement, les plasmas ont été incubés pendant 3 min avec les facteurs de la coagulation IX activé et X, puis le substrat chromogénique du FX activé a été incubé pendant 20 min. La densité optique a été suivie pendant 20 min à 405 nm. L'activité inhibitrice est exprimée en unité Bethesda (BU) par mL de sérum, qui correspond à l'inverse de la concentration en plasma donnant 50% d'activité FVIII résiduelle.

Expérience d'activation d'un hybridome T spécifique du FVIII

Les splénocytes de souris SUREL1 transgéniques, qui expriment un HLA-DRB1*0101 et qui sont délétées pour le CMH II murin (Pajot et al. 2004), ont été collectés après la dilacération mécanique de la rate. Les globules rouges ont été lysés avec une solution hypotonique d'ammonium-chloride-potassium (ACK) (Life Technologies). Les globules blancs spléniques (250 000 cellules) ont été mis en co-culture avec un hybridome T murin, restreint au HLA-DRB1*0101 et spécifique du domaine C1 du FVIII (²⁰¹³LFLVYSNKC²⁰²¹): 1G8 A2.1 (100 000 cellules) en milieu RPMI-Glutamax (Life Technologies) supplémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine (Life Technologies), 10% de sérum de veau foetal (Life Technologies) et du 2-mercaptoéthanol (Life Technologies) (S. Delignat et al. 2014). Les cellules ont pour finir été stimulées pendant 24 heures avec 3,3 µg de FVIII BDD (NovoEight®) seul ou pré-incubé pendant 30 min à 37°C avec 2 µg de BO2C11, BOIIB2 ou KM33 FabFc (20 nM de chaque espèce) ou avec 1µg/ mL de Concanavaline A en contrôle positif d'activation. L'activation de l'hybridome T a été mesurée par la quantification de l'IL-2 murine sécrétée dans les surnageants de culture par ELISA (BD Biosciences).

II - 3 - Résultats

Pour déterminer si le transfert transplacentaire de FVIII lors du développement foetal permettait d'induire une tolérance spécifique envers le FVIII thérapeutique, j'ai utilisé deux modèles pré-cliniques : un modèle de souris naïves hémophiles A (FVIII-KO) et un modèle de souris FVIII-KO exprimant le FVIII BDD humain de manière endogène.

II - 3.A - Induction de tolérance pour le FVIII thérapeutique chez la souris FVIII-KO

Les femelles FVIII-KO gestantes, ont été traitées avec 50 µg de FVIII BDD pré-incubé pendant 30 min à 4°C avec 30 µg de KM33 FabFc ou KM33 FabFc^{IHH} à E16.5, E17.5 et E18.5. Pour suivre le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII au sein de la descendance, j'ai traité les souriceaux une fois par semaine pendant 6 semaines avec 0,5 µg de FVIII BDD. Les sérums de la descendance ont été collectés une semaine avant le début de l'immunisation puis une fois par semaine à partir de la troisième semaine de traitement (Figure 9 A). J'ai ensuite déterminé si la descendance des souris FVIII-KO développait une réponse immunitaire anti-FVIII après le transfert transplacentaire de FVIII par ELISA et par test fonctionnel de coagulation (Bethesda). Que les mères aient été traitées avec KM33 FabFc, permettant le transfert transplacentaire de FVIII, ou avec KM33 FabFc^{IHH}, ne médiant pas le transfert transplacentaire de FVIII (montré dans la première partie des résultats), les souriceaux développaient une réponse immunitaire anti-FVIII se traduisant par l'apparition d'IgGs anti-FVIII inhibitrices (Figure 9 B et C).

II -3.B - Induction de tolérance pour le FVIII thérapeutique dans le modèle de FVIII-KO exprimant le FVIII humain transgénique

Le modèle pré-clinique de souris exprimant le FVIII humain de façon endogène a été établi par le traitement de souris FVIII-KO avec des vecteurs AAV8 FVIII-V3 (2×10^{13} vg/kg), contenant le gène du FVIII BDD humain (McIntosh et al. 2013). Ainsi, la descendance de ces souris est-elle hémophile A. Les souris gestantes traitées aux AAV-FVIII ont été traitées avec 90 µg de KM33 FabFc ou KM33 FabFc^{IHH} à E15.5. Tout comme pour le précédent modèle murin, les souriceaux ont été traités avec du FVIII thérapeutique (0,5 µg) pendant 6 semaines et les sérums ont été collectés (Figure 9A).

La demi-vie de KM33 FabFc et de KM33 FabFc^{IHH} étant de 0,23 jours et 0,14 jours respectivement chez la souris FVIII-KO (ils restent en circulation au moins 8 jours après

l'injection), et la présence de FVIII n'altérant pas cette demi-vie (résultats non montrés), une seule injection de KM33 devrait suffire pour favoriser le passage transplacentaire de FVIII endogène de E15 jusqu'à la fin de la grossesse.

J'ai dans un premier temps confirmé l'absence d'expression du FVIII par la descendance des souris traitées aux AAV-FVIII par ELISA (résultats non montrés). J'ai ensuite étudié le développement d'IgGs anti-FVIII dans les deux groupes de souriceaux par ELISA. Dans ce modèle murin également, les souriceaux développaient des IgGs anti-FVIII indépendamment du FabFc utilisé pour traiter les mères (Figure 9 D).

Au sein de ces modèles, le transfert transplacentaire de FVIII ne permet donc pas l'induction de tolérance.

II - 3.C - Étude de l'impact des FabFcs sur la présentation du FVIII aux cellules T

L'absence d'induction de tolérance peut avoir plusieurs causes non exclusives. Nous pouvons imaginer que la quantité de FVIII atteignant la circulation fœtale (résultat montré en partie 1 des Résultats) est trop faible pour induire une tolérance immunitaire. En effet, lors d'une précédente étude le passage de C2Fc murin était 30 fois plus important que le passage de FVIII à l'aide des FabFcs (résultats non publiés). Une seconde hypothèse envisageable est que la fixation des FabFcs au FVIII transféré réduise la présentation du FVIII aux lymphocytes T dans l'organisme du fœtus.

Les domaines C1 et C2 sont hautement impliqués dans l'endocytose du FVIII par les cellules présentatrices d'antigènes (Gangadharan et al. 2017; Wroblewska et al. 2012). Par ailleurs, il a été démontré que KM33 inhibe l'endocytose du FVIII par des cellules dendritiques dérivées de monocytes humaines et par des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris, et prévient de la formation d'IgGs anti-FVIII chez la souris hémophile A après traitement substitutif à l'aide de FVIII thérapeutique (Herczenik et al. 2012).

J'ai donc déterminé si l'absence de mise en place d'induction de tolérance chez la descendance des souris traitées avec KM33 était associée à une réduction de présentation des épitopes du FVIII aux cellules T, ce qui aurait pour conséquence probable un échec de différenciation des cellules T anti-FVIII naïfs vers un profil tolérogène. Pour cela, j'ai utilisé un hybridome T restreint au HLA-DRB1*0101 et spécifique du domaine C1 (²⁰¹³LFLVYSNKC²⁰²¹, épitope ne chevauchant pas l'épitope de C1 reconnu par KM33), généré précédemment par notre laboratoire (Delignat et al. 2014). Les hybridomes T murins ont été mis en co-culture avec des splénocytes de souris SUREL1 qui expriment cet allèle du HLA. Les cellules ont été

stimulées avec du FVIII seul ou pré-incubé en ratio équimolaire avec BOIIB2 (anti-A2), BO2C11 (anti-C2) et KM33 FabFc (anti-C1), ou avec de la Concanavaleine A (ConA) en contrôle positif d'activation. L'activation de l'hybridome T, se traduisant par une sécrétion d'IL-2 murine, a été quantifiée dans les surnageants par ELISA. L'incubation de l'hybridome T avec la ConA, permet leur activation. De même, l'incubation des cellules en présence de FVIII permettait l'activation de l'hybridome T, ce qui traduit l'endocytose du FVIII par les cellules dendritiques, son apprêtement et sa présentation par les CMH II au TCR des lymphocytes T CD4⁺. La pré-incubation du FVIII avec BOIIB2 FabFc n'altère pas sa présentation à l'hybridome T. À l'inverse, l'incubation du FVIII avec KM33 FabFc et à moindre mesure avec BO2C11 FabFc réduit fortement la présentation du FVIII (Figure 9 E).

Ces résultats, qui ne sont pas encore publiés, révèlent que l'utilisation de FabFc spécifiques des domaines C1 et/ou C2 du FVIII, si elle permet le passage transplacentaire du FVIII de la circulation maternelle vers la circulation fœtale, ne permet pas d'induire de tolérance immunitaire spécifique. Les résultats obtenus *in vitro* indiquent que l'endocytose du FVIII est inhibée par le FabFc anti-C1 et réduite par le FabFc anti-C2, ce qui empêche la présentation des peptides du FVIII aux cellules T spécifiques du FVIII. Si le même phénomène survient *in vivo*, il explique l'absence d'induction de tolérance immunitaire par l'absence d'induction de cellules Treg.

RÉSULTATS - Induction de tolérance envers le FVIII thérapeutique

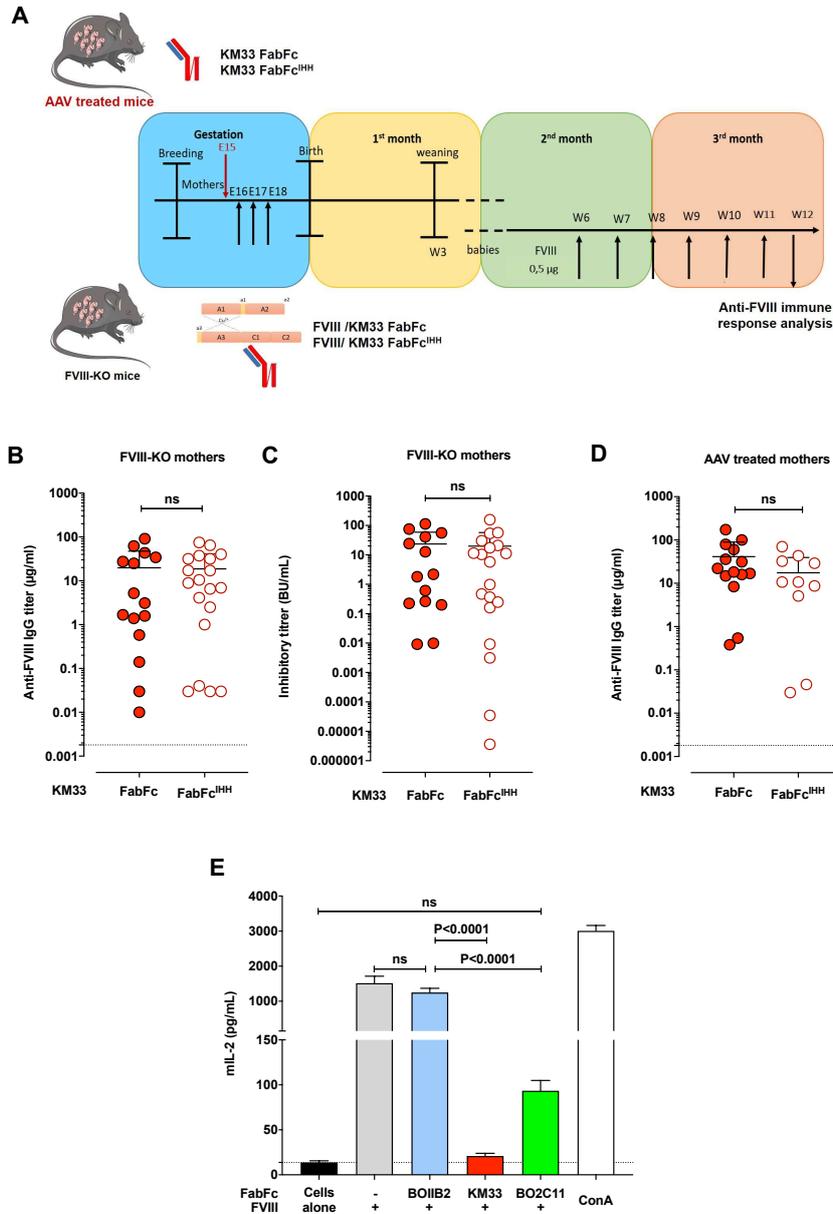


Figure 9 Induction de tolérance immunitaire envers le FVIII thérapeutique. (A) Traitements des souris FVIII-KO, des souris traitées aux AAV-FVIII et de leur descendance. Les souris FVIII-KO gestantes ($n=3-4$) ont été traitées avec du FVIII BDD (50 µg) pré-incubé pendant 30 min à 4 °C avec KM33 FabFc ou KM33 FabFc^{HH} (30 µg) à E16.5, E17.5 et E18.5. Les souris gestantes préalablement traitées aux AAV-FVIII ($n=2-3$) ont été injectées avec KM33 FabFc ou KM33 FabFc^{HH} (90 µg) à E15.5. La descendance a été traitée une fois par semaine pendant 6 semaines avec du FVIII BDD (0,5 µg), et les sérums ont été collectés une fois par semaine pour suivre le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII. **(B) Développement d'IgGs anti-FVIII au sein de la descendance des souris FVIII KO.** La concentration d'IgGs anti-FVIII (µg/mL) au sein de la descendance des souris FVIII-KO a été quantifiée en réalisant un ELISA sur les sérums de souris collectés après la 6^{ème} injection de FVIII. Chaque point représente un individu (mean±SD). La ligne pointillée représente le seuil de détection des IgGs anti-FVIII (validé à l'aide de plasma de souris FVIII-KO naïves non-traitées au FVIII). Les différences statistiques ont été évaluées à l'aide d'un test non-paramétrique Mann-Whitney (ns = non significatif). **(C) Développement d'inhibiteurs anti-FVIII au sein de la descendance des souris FVIII-KO.** La présence d'inhibiteurs anti-FVIII au sein des sérums de souris collectés après la 6^{ème} injection de FVIII a été mesurée à l'aide d'un test fonctionnel de coagulation Bethesda modifié. Chaque point représente un individu. Les différentes statistiques ont été évaluées à l'aide d'un test non-paramétrique Mann-Whitney (ns = non significatif). **(D) Développement d'IgGs anti-FVIII au sein de la descendance des souris traitées aux AAV.** La concentration d'IgGs anti-FVIII (µg/mL) au sein de la descendance des souris traitées aux AAV a été quantifiée de la même manière qu'en figure 9A. Les différences statistiques ont été évaluées à l'aide d'un test non-paramétrique Mann-Whitney (ns = non significatif). **(E) Étude de l'impact des FabFc sur l'activation de cellules T spécifiques du FVIII.** Des splénocytes de souris SUREL1 exprimant un HLA-DRB1*0101 ont été mis en co-culture avec un hybridome T murin spécifique du domaine C1 du FVIII, et stimulés avec du FVIII seul ou pré-incubé avec les différents FabFc en concentration équimolaire. L'activation des hybridomes T, se traduisant par la sécrétion d'IL-2 murine (pg/mL), a été quantifiée par ELISA (mean±SD, $n=3$ expériences indépendantes). La ligne en pointillée représente la moyenne de sécrétion d'IL-2 murine par les cellules non stimulées. Les différences statistiques ont été calculées à l'aide d'un test ANOVA multiparamétrique (ns = non significatif).

DISCUSSION

Discussion

Les patients hémophiles A, atteints d'un déficit en FVIII fonctionnel, développent selon la gravité de leur pathologie des hémorragies spontanées ou provoquées (lors de traumatismes et de chirurgies) dans les tissus mous et les articulations. Afin de prévenir ou de traiter leurs saignements et d'éviter le développement de complications telles que l'arthropathie, les patients hémophiles A sont traités avec du FVIII thérapeutique, rétablissant ainsi leur coagulation. Toutefois, le FVIII est une molécule fortement immunogène, et 5 à 30% des patients hémophiles A traités développent une réponse immunitaire anti-FVIII. Cette réponse immunitaire, causée en partie par l'absence d'établissement de tolérance, aboutit à la formation d'IgGs anti-FVIII, inhibitrices de son activité pro-coagulante. Ces anticorps annihilent l'effet thérapeutique du FVIII de substitution, des approches les éradiquant ou capables de prévenir leur développement s'avèrent donc nécessaires. À ce jour, l'unique approche disponible est l'induction de tolérance immunitaire, une thérapie lourde pour les patients et étant efficace chez seulement 70% des patients traités.

Lorsqu'une femme enceinte est conductrice de la maladie, des mutations sur le gène *F8* du fœtus peuvent être recherchées après la 15^{ème} semaine de grossesse afin de déterminer si, dans le cas d'un bébé mâle, il sera atteint ou non par la maladie (Saxena & Ranjan 2014). De plus, le système immunitaire, et donc la tolérance aux protéines du soi, s'établissent *in utero*, à partir de la 13^{ème} semaine de grossesse chez l'humain et à partir du 10^{ème} jour de gestation chez la souris (Mimoun et al. 2020). Enfin, le transfert d'IgGs maternelles, comme le transfert de protéines-Fc ont été démontrés comme modulant les répertoires T au sein de la descendance après leur transfert transplacentaire (Culina et al. 2015; Gupta et al. 2015; Meslier et al. 2010; Rueff-Juy et al. 1998). Le développement fœtal est donc la fenêtre idéale pour induire une tolérance envers le FVIII thérapeutique.

L'objectif de mon travail de thèse, était de développer une nouvelle approche prévenant l'apparition d'inhibiteurs après un traitement de substitution au sein d'une descendance hémophile A. Pour cela, nous souhaitons tirer profit du mécanisme impliqué dans le transfert transplacentaire des IgGs maternelles, et ainsi introduire le FVIII maternel dans la circulation fœtale lors de l'ontogénie des lymphocytes T afin d'induire une tolérance spécifique au FVIII.

DISCUSSION

I - Impact des propriétés intrinsèques aux FabFcs et au FVIII sur le transfert transplacentaire

I - 1 - Génération d'anticorps monovalents humains anti-FVIII (FabFc)

Mon premier objectif a été de générer des anticorps spécifiques du FVIII afin de promouvoir sa transcytose vers la circulation fœtale. Trois anticorps ont été générés : BO2C11, BOIIB2 et KM33. BO2C11 et BOIIB2 ont été clonés à partir d'IgG4 inhibitrices de patients hémophiles A (Jacquemin et al. 1998, 2010). La région variable de la chaîne lourde de KM33 a été clonée à partir d'une IgG4 inhibitrice d'un patient hémophile A et la région variable de la chaîne légère provient d'une banque de « single chain variable fragment » (scFv) produite par phage display à partir de lymphocytes B isolés de donneurs sains (van den Brink et al. 2001). BOIIB2 cible le domaine A2 du FVIII (484 à 508 et glutamines 389,390, et 391), BO2C11 (2170 à 2216 et 2303 à 2332 ; leucine 2251, 2252, méthionine 2199, et arginine 2215, 2220), et KM33 fixe le domaine C1 (arginine 2090, leucine 2092, et phenylalanine 2093) (Jacquemin et al. 1998, 2010; van den Brink et al. 2001).

Bien que l'ensemble de cette étude ait été réalisée dans un modèle pré-clinique murin d'hémophilie A, nous avons fait le choix de générer nos anticorps avec des chaînes lourdes et légères humaines. A l'inverse du FcRn humain qui est très sélectif, le FcRn murin fixe avec une très forte affinité les IgGs de différentes espèces et est même vingt fois plus affiné pour les IgGs humaines que le FcRn humain (Dumont et al. 2012). La chaîne lourde humaine, ne devrait donc pas impacter le transfert transplacentaire au sein de notre modèle animal. De plus, l'utilisation d'IgGs humaines a facilité la détection du transfert des FabFcs au sein de la circulation fœtale. Enfin, cela aurait permis une translation directe de notre approche vers la clinique.

Nous avons également fait le choix de générer des anticorps monovalents disposant d'un site de fixation d'antigène unique. Ce choix se justifie par deux points. Le premier est que nous ignorions si le transfert transplacentaire était limité par la taille des complexes immuns. En effet, un complexe formé d'une IgG1 et de deux molécules de FVIII représenterait un poids moléculaire de plus de 480 kDa. Ensuite, le FVIII étant une molécule de très lourd poids moléculaire et encombrante dans l'espace, deux molécules de FVIII ne peuvent peut-être pas être fixées sur le même anticorps, quand bien même les IgGs sont connues pour la flexibilité

DISCUSSION

de leur partie Fab, comme cela a été observé par Gish et al. dans le cas de Fab anti-FVIII de souris liés au FVIII (Figure 10).

Après avoir produit mes différents FabFc, je les ai caractérisés. L'ensemble des mes anticorps fixaient de manière dose dépendante le FVIII humain. Par ailleurs, l'affinité des anticorps originaux sont de 0,9 nM et 0,1 nM pour BO2C11, KM33 respectivement (Dimitrov et al. 2009; van den Brink et al. 2001). BO2C11 FabFc et KM33 FabFc entraient en compétition avec le VWF pour fixer le FVIII, à l'inverse BOIIB2 FabFc n'inhibait pas la fixation du VWF au FVIII. Ces anticorps fixaient le FcRn avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. Comme attendu, BO2C11, BOIIB2 et KM33 FabFc inhibaient l'activité pro-coagulante du FVIII. Enfin, BO2C11 et KM33 réduisent l'endocytose du FVIII par les cellules présentatrices d'antigènes (Gangadharan et al. 2017; Herczenik et al. 2012).

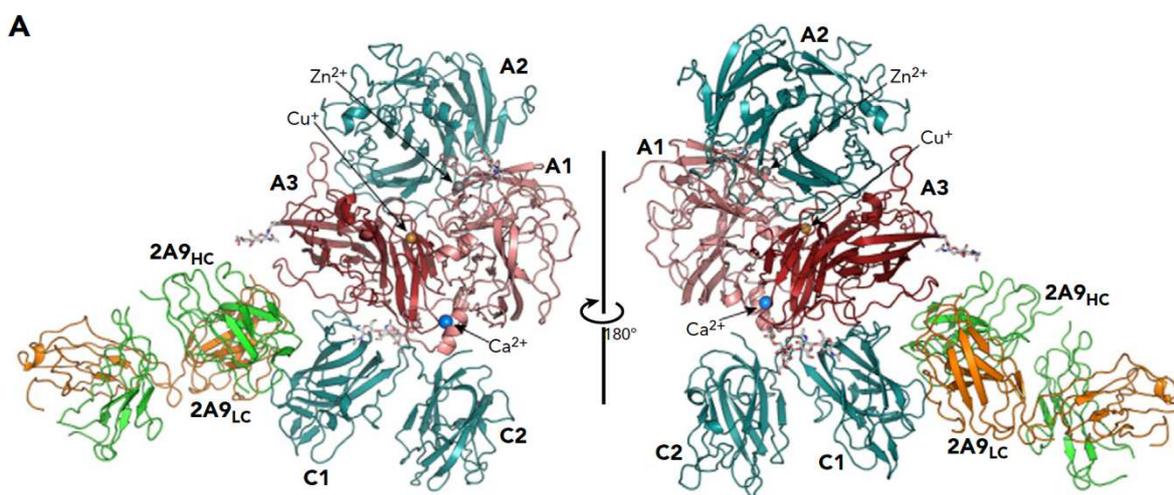


Figure 10 Structure cristallographique du FVIII chimérique humain/porcin ET3i et du Fab de souris anti-C1 2A9 issu de la digestion par la papaine d'un inhibiteur de souris anti-FVIII humain (Gish et al. 2021)

I - 2 - Génération d'un anticorps non-inhibiteur

L'utilisation d'inhibiteurs n'étant pas compatible avec une thérapie de remplacement *in utero* et potentiellement avec l'induction de tolérance, j'ai également sélectionné un anticorps non-inhibiteur du FVIII. EL14 a été cloné à partir d'un anticorps non inhibiteur provenant d'un patient ayant développé une réponse auto-immune contre le FVIII (souffrant donc d'hémophilie A acquise) (Lewis et al. 2005; van den Brink et al. 2000b). Cet anticorps cible le domaine C2 du FVIII (leucine 2207-méthionine 2321) avec une constante de dissociation de 1.1 nM (Lewis et al. 2005; van den Brink et al. 2000b). Tout comme pour le reste de mes FabFc, j'ai caractérisé EL14 après sa production. Comme attendu, ce FabFc fixait le FVIII (Figure 11A), n'inhibait pas la fixation du VWF au FVIII (Figure 11B) et n'était pas inhibiteur de la fonction pro-coagulante du FVIII (Figure 11C).

DISCUSSION

I - 3 - Transfert transplacentaire des FabFcs et du FVIII humain

Le transfert transplacentaire des différents FabFcs pré-incubés avec le FVIII humain, a été validé au sein d'un modèle murin FVIII-KO. Indépendamment de leurs spécificités épitopiques, les FabFcs traversaient le placenta et atteignaient la circulation fœtale. Néanmoins, tandis qu'en moyenne 2,2 nM de BO2C11, BOIIB2 et EL14 rejoignaient la circulation fœtale, plus de 7 nM de KM33 FabFc avait été détecté chez les fœtus laissant penser que l'épitope ciblé par le FabFc impacte le transfert transplacentaire.

Cette observation a été ensuite confirmée lors de l'étude du passage du FVIII humain par les FabFcs. En effet, tandis que la pré-incubation du FVIII avec BO2C11 FabFc et KM33 FabFc permettait son transfert transplacentaire au sein de la descendance, son transfert était fortement réduit voire totalement nul lorsqu'il était incubé avec BOIIB2 FabFc et EL14 FabFc respectivement (Figure 11D).

I - 4 - Impact du VWF

Ma première idée pour expliquer le transfert réduit du FVIII avec BOIIB2 et EL14 FabFc fût l'impact du VWF endogène. Cette hypothèse a été réfutée par deux points : I) nous avons tenté sans succès de transférer du FVIII avec BOIIB2 FabFc au sein d'un modèle murin déficient pour le FVIII et le VWF ; II) la quantité de FVIII (50 µg soit 150 nM) devrait saturer le VWF endogène.

I - 5 - Impact des phospholipides

La différence de passage du FVIII lorsqu'il était pré-incubé avec BO2C11 (un anti-C2 inhibiteur) et EL14 (un anti-C2 non-inhibiteur), laisse penser que le domaine du FVIII ciblé n'est pas le seul paramètre influant sur la transcytose. Les anticorps inhibiteurs ont pour caractéristique d'inhiber l'interaction du FVIII avec ses partenaires de la coagulation. Par ailleurs, les domaines C1 et C2 sont impliqués dans l'ancrage du FVIII aux phospholipides (Lenting et al. 1998; Meems et al. 2009) et BO2C11 et KM33 entrent en compétition avec les phospholipides pour la fixation au FVIII (Jacquemin et al. 1998; Meems et al. 2009). Il est possible que le faible transfert du FVIII pré-incubé avec BOIIB2 et EL14, était causé par la fixation du FVIII aux PL. Néanmoins, la fixation de EL14 au FVIII n'est pas perturbée par des vésicules de PL (Lewis et al. 2005). L'absence de transfert transplacentaire du FVIII n'est donc probablement pas liée à sa fixation aux PL.

DISCUSSION

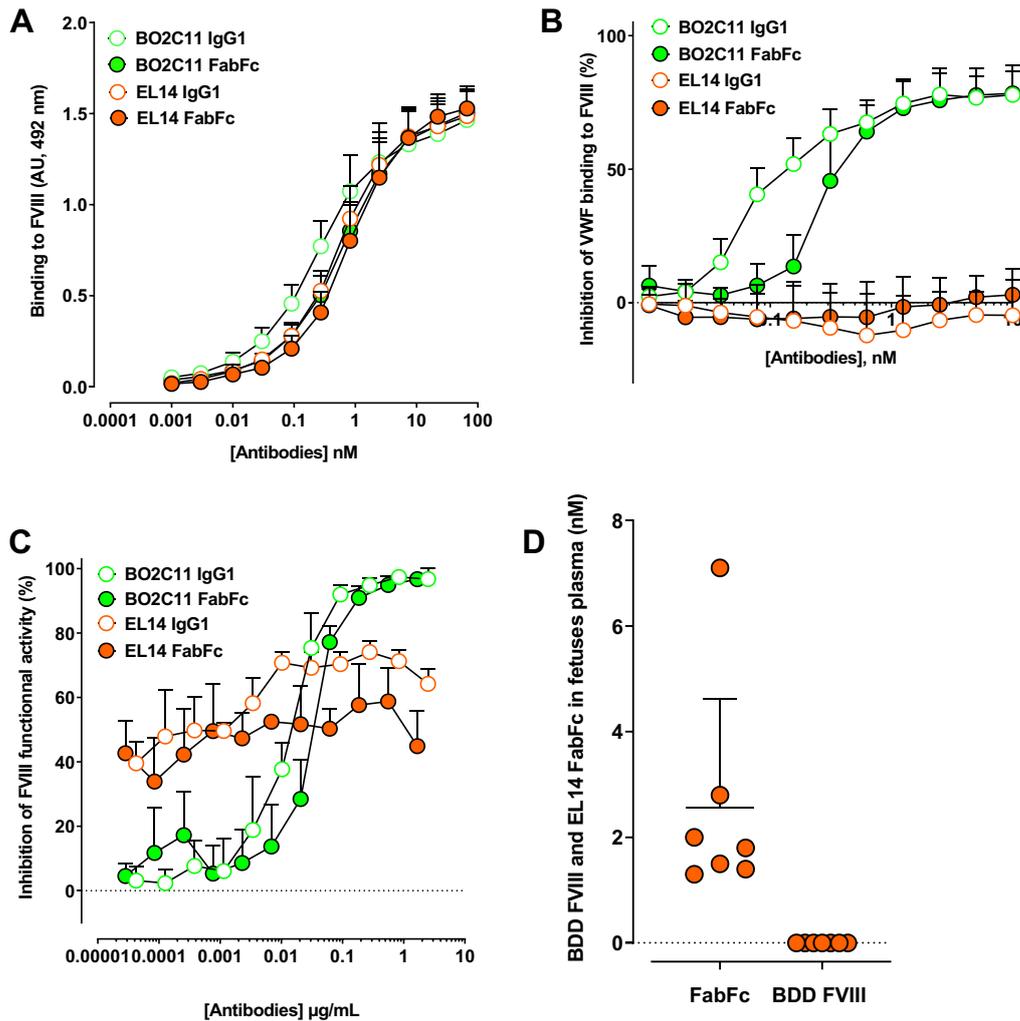


Figure 11 *Caractérisation et passage transplacentaire d'EL14 FabFc. (A) Fixation de BO2C11 et EL14 au FVIII humain.* EL14 et BO2C11 IgG1 et FabFc ont été incubés en dilution en série sur une plaque recouverte de FVIII entier humain. Le graphe montre la fixation des anticorps sur le FVIII en fonction de leur concentration, détectée avec un anticorps secondaire anti-Fc IgG-HRP. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (moyenne±SD, 3 expériences indépendantes), basés sur la DO mesurée à 492 nm. **(B) Inhibition de la fixation du VWF au FVIII.** Des dilutions successives de EL14 et BO2C11 IgG1 et FabFc ont été pré-incubés avec du FVIII humain entier avant d'être incubés sur du VWF immobilisé. La fixation du FVIII a été révélée à l'aide d'une IgG de souris anti-domaine A2. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de fixation du FVIII au VWF (moyenne±SD, 3 expériences indépendantes). **(C) Inhibition de l'activité fonctionnelle du FVIII par EL14.** L'activité neutralisante de EL14 et BO2C11 IgG1 et FabFc a été mesurée par un test de Bethesda modifié. Des dilutions en série d'anticorps ont été pré-incubées avec du plasma humain standard comme source de FVIII pendant 2h à 37°C. L'activité résiduelle du FVIII a été mesurée avec un kit chromogénique. Brevement, les échantillons ont été incubés avec du FIX activé et du FX pendant 3 min puis un substrat chromogénique du FX activé a été incubé pendant 20 min. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de l'activité du FVIII en fonction de la concentration des anticorps (moyenne±SD, 3 expériences indépendantes). **(D) Passage transplacentaire de EL14 FabFc et du FVIII BDD chez la souris FVIII-KO.** Des souris FVIII-KO gestantes (n=2) ont été injectées à E17.5 avec 50 µg de FVIII BDD pré-incubé avec 29.1 µg de EL14 FabFc pendant 30 min à 4°C. Le sang des fœtus a été collecté 4h après l'injection et deux ELISA ont été réalisés pour détecter respectivement le FabFc et le FVIII dans la circulation fœtale. Un point représente un pool de 2-3 fœtus. Les résultats sont exprimés en nanomolaire (moyenne±SD).

DISCUSSION

I - 6 - Impact des récepteurs cataboliques du FVIII

Le FVIII interagit également avec différents récepteurs cataboliques par l'intermédiaire de ses différents domaines (Bovenschen et al. 2005; Pegon et al. 2012; Rastegarlarlari et al. 2012; Saenko et al. 1999; Swystun et al. 2018, 2019). Ce catabolisme est connu pour avoir lieu particulièrement dans le foie et dans la rate (Navarrete et al. 2009; Swystun et al. 2018; van Schooten et al. 2008). Cette donnée fait écho aux résultats d'immunofluorescence que j'ai obtenus. En effet, une partie importante du FVIII pré-incubé avec KM33 FabFc était localisée dans le foie et dans la rate 30 minutes après l'injection. Lorsque nous avons étudié l'élimination du FVIII au cours du temps dans la circulation maternelle, nous avons remarqué que l'incubation du FVIII avec EL14 conduisait à une élimination plus rapide par rapport à BO2C11 (10,9 nM/h et 1,6 nM/h respectivement). Le catabolisme important du FVIII pré-incubé avec EL14 pourrait donc impacter son transfert. L'un des récepteurs cataboliques pouvant être impliqué dans le faible transfert transplacentaire du FVIII en présence de EL14 est le récepteur « Lipoprotein receptor-related 1 » (LRP1). Le récepteur LRP1 ou CD91, possède 3 sites de fixation pour le FVIII, au sein des domaines A2, A3 et C2 (Bovenschen et al. 2003a; Lenting et al. 1999; Sarafanov et al. 2006). Par ailleurs, son implication dans le catabolisme du FVIII a été démontrée au sein d'un modèle murin où la délétion de LRP1 est induite (système Cre-Lox). Au sein de ce modèle les taux de FVIII plasmatique et sa demi-vie sont augmentés (Bovenschen et al. 2003b).

Il a été démontré qu'un anti-C2 (ESH4), qui partage le même épitope que BO2C11 (Nguyen et al. 2014), inhibe la fixation du FVIII au LRP (Lenting et al. 1999). Nous pouvons donc imaginer que BO2C11 lui-même inhibe la fixation du FVIII à LRP1. Je pourrais réaliser des expériences de résonance plasmon de surface pour confirmer l'absence de fixation du FVIII pré-incubé avec BO2C11, et ainsi confirmer cette hypothèse.

KM33, conférant le meilleur passage du FVIII en circulation foetale, interfère également dans la fixation du FVIII au LRP1 (Meems et al. 2011), mais EL14 n'inhibe pas la fixation du FVIII à LRP1 (Bloem et al. 2019). LRP1 pourrait donc impacter le transfert transplacentaire du FVIII pré-incubé avec EL14.

Nous avons remarqué que le passage transplacentaire du domaine C2 à l'aide du BO2C11 FabFc et des C2Fc humains et murins étaient respectivement 60 fois et 30 fois plus important que la transcytose du FVIII avec BO2C11 FabFc. Le catabolisme du domaine C2 pré-incubé avec BO2C11 et des C2Fc humain et murin chez les femelles gestantes, était de $0,17 \pm$

DISCUSSION

0,05 nM/h, $0,35 \pm 0,07$ nM/h, et $0,3 \pm 0,1$ nM/h respectivement contre $1,6 \pm 0,7$ pour le FVIII pré-incubé avec BO2C11 FabFc. La différence de passage pourrait être due au plus faible catabolisme du domaine C2 seul chez la mère. Il a été démontré que le domaine C2 purifié a une très mauvaise affinité (3602 ± 1743 nM) pour le récepteur LRP et que son association à LRP est bien inférieure à celle du FVIII (Bovenschen et al. 2003a; Lenting et al. 1999). Pour valider l'implication de LRP1 dans le catabolisme du FVIII au sein de notre modèle nous pourrions réaliser des croisements afin d'obtenir un phénotype de souris FVIII-KO invalidées pour LRP1 dans le foie. En effet, un modèle de souris invalidée pour LRP1 par le système Cre-Lox au sein des hépatocytes est disponible (Basford et al. 2011), la délétion constitutive du LRP1 conférant un phénotype léthal (Herz et al. 1992). Cela nous permettrait également de déterminer si le faible passage transplacentaire est causé par l'important catabolisme du FVIII chez la mère. Nous pourrions également introduire des mutations dans le FVIII pour inhiber sa fixation aux récepteurs cataboliques tester son transfert transplacentaire avec EL14.

Le domaine A2 étant également ciblé par le récepteur LRP1, au même épitope que BOIIB2 (Jacquemin et al. 2010; Sarafanov et al. 2006) ; et BOIIB2 ne permettant pas le transfert transplacentaire, ni la compétition au VWF, nous pouvons imaginer que, lorsque la fixation à LRP1 est impossible, le catabolisme du FVIII est compensé par d'autres récepteurs ciblant d'autres domaines du FVIII, ou reconnaissant les complexes VWF/FVIII tels que Siglec 5 (Pegon et al. 2012) ou CLEC4M (Swystun et al. 2018).

Autrement dit, quel que soit l'épitope ciblé par le FabFc, le transfert transplacentaire du FVIII sera limité par son important catabolisme chez la mère, médié par différents récepteurs cataboliques ciblant les différents domaines du FVIII.

Les ratios molaires FVIII/FabFc mesurés dans la circulation fœtale 4 heures après le traitement des femelles gestantes, étaient 12 fois plus faibles que les ratios détectés chez la mère à 4 heures. Ces résultats suggèrent que le FVIII se dissocie du KM33. Le pH acide n'impactait pas la fixation des FabFcs au FVIII, suggérant que la dissociation des complexes n'a pas lieu au niveau des endosomes. La dissociation avait donc lieu ailleurs menant à la rétention du FVIII dans le placenta. Mes expériences de détection du FVIII au sein de placentas de souris traitées avec le FVIII seul, ou le FVIII pré-incubé avec KM33 FabFc et KM33 FabFc^{IHH}, indiquent une importante accumulation du FVIII à la membrane des cellules du syncytiotrophoblaste du placenta, dans chacune des conditions. Cela suggère que l'entrée du FVIII au sein des syncytiotrophoblastes n'est pas dépendante du FcRn, ce qui va dans le même sens que le

DISCUSSION

dogme actuel du passage transplacentaire, à savoir que l'internalisation des IgGs est non-spécifique (« fluid phase »). Par ailleurs, la rétention du FVIII équivalente lorsqu'il était pré-incubé avec KM33 FabFc ou KM33 FabFc^{I^{HH}} suggère que cette rétention est également indépendante du FcRn. Il est intéressant de noter qu'à la fois les syncytiotrophoblastes humains et murins expriment des récepteurs cataboliques du FVIII tels que Siglec5, LRP1 et STAB2 (Ali et al. 2014; Cao et al. 2014; Wassef et al. 2012). Pour identifier le/les récepteurs impliqués dans la rétention du FVIII au sein du placenta, nous pourrions réaliser des expériences de colocalisation entre le FVIII et les différents récepteurs potentiels.

Les macrophages placentaires (ou cellules de Hofbaeur), et plus particulièrement les macrophages de sous-type M2, expriment également des récepteurs d'endocytose cataboliques et non-cataboliques du FVIII tels que CLEC4M et CD206. Ces macrophages sont abondants et en contact serré avec les cellules du trophoblaste dans le placenta humain et le placenta murin (Lozach et al. 2007; Thomas et al. 2021; Zhang et al. 2020). Le récepteur CD206, un récepteur d'endocytose du FVIII non-catabolique (Dasgupta et al. 2007a; Repessé et al. 2012), est spécifique des glycosylations se terminant par un mannose. Dans le cas du FVIII, le CD206 reconnaît des glycanes ancrés sur les Asn 239 et 2118 des domaines A1 et C1 respectivement (en dehors de l'épitope de KM33). Néanmoins, l'utilisation d'un FVIII BDD déglycosylé en position 2118, n'a pas permis d'augmenter le passage transplacentaire. Le récepteur CD206 n'est donc probablement pas impliqué dans la rétention du FVIII dans le placenta.

Enfin, il m'a été impossible de détecter le KM33 dans les placentas des souris. Nous savons que le passage du KM33 FabFc est 60 fois supérieur à celui du FVIII. Cela suggère qu'après la dissociation du FVIII et du KM33, le FVIII est retenu dans le placenta après son interaction avec un récepteur d'endocytose du FVIII, tandis que le KM33 est transféré vers la circulation foetale. Un second indice allant dans le sens de cette hypothèse, est le plus faible passage transplacentaire du FVIII^{IFc}. Le FVIII^{IFc} est probablement également retenu dans le placenta par un récepteur d'endocytose du FVIII.

I - 7 - Impact de la taille des complexes sur le transfert transplacentaire

L'une des justifications quant à l'utilisation d'anticorps monovalents anti-FVIII plutôt que des IgG1 divalentes, était que nous ignorions si la taille des complexes immuns impactait ou non le transfert transplacentaire. Au cours de mes recherches, j'ai constaté que le FVIII entier d'un poids moléculaire de 280 kDa était 15 fois moins bien transféré que le FVIII BDD

DISCUSSION

d'un poids moléculaire de 165 kDa et 900 fois moins bien transféré que le domaine C2 d'un poids moléculaire de 19 kDa. Par ailleurs, l'élimination du FVIII entier chez les mères est comparable à celle du FVIII BDD ($2 \pm 0,7$ nM/h contre $1,6 \pm 0,7$ nM/h lorsqu'ils sont pré-incubés avec BO2C11 FabFc). Le catabolisme du FVIII entier n'impacte donc probablement pas sa transcytose. Néanmoins, nous ne pouvons pas être certains que la taille du complexe FabFc/FVIII entier soit responsable de sa faible transcytose. En effet, le domaine B du FVIII est riche en glycosylations dont des glycanes incomplets dépourvus d'acides sialiques (Pipe 2009), ciblées par le récepteur catabolique « asialoglycoprotein receptor » (ASGPR) (Bovenschen et al. 2005). Ce récepteur est exprimé par les hépatocytes murins et humain (Bon et al. 2017; Braun et al. 1996), ainsi que par le placenta humain (Vyas et al. 2018). Pour déterminer si la plus faible transcytose du FVIII entier est causée par la fixation de ASGPR aux glycosylations du domaine B, nous pourrions réaliser des expériences I) de transfert transplacentaire avec du FVIII entier déglycosylé sur le domaine B et II) de colocalisation du FVIII et d'ASGPR dans le placenta.

I - 8 - Impact de la partie Fc sur le transfert transplacentaire

Comme attendu, le transfert transplacentaire de FVIII dépend de la fixation du FabFc au FcRn. Néanmoins, j'ai obtenu un résultat surprenant lorsque j'ai réalisé des expériences de transfert avec KM33 FabFc^{N297A}. KM33 FabFc^{N297A} ne fixe ni les FcγRs humains ni les FcγRs murins, mais se lie au FcRn de manière identique à KM33 FabFc. En effet, le transfert du FVIII et du FabFc lui-même étaient augmentés. Chez l'humain, le placenta et les cellules endothéliales fœtales, qui forment la dernière barrière à traverser par les IgGs pour rejoindre la circulation fœtale, sont connus pour exprimer les FcγRI, FcγRIIA/B/C, et FcγRIII (Kristoffersen et al. 1990; Martinez et al. 2018, 2019; Simister 2003). Bien que les FcγRs aient toujours été exclus du processus de transfert des IgGs maternelles (Firan et al. 2001; Vaccaro et al. 2006), deux études récentes mentionnent l'importance des glycosylations de la partie Fc dans le transfert chez l'humain et impliquent le récepteur de faible affinité FcγRIIIa (Jennewein et al. 2019; Martinez et al. 2019). Pourtant, par l'étude du transfert transplacentaire d'IgGs humaines au sein d'un modèle de souris humanisées pour le FcRn et les FcγRs, que Borghi et al. ont démontré que seule la fixation au FcRn était indispensable à la transcytose des IgGs et que le FcγRIIIa n'était pas impliqué (Borghi et al. 2020).

DISCUSSION

Les FcγRs n'étant pas directement impliqués dans le processus de transcytose, nous pouvons imaginer que le transfert de FVIII est augmenté car le catabolisme des complexes immuns chez la mère est réduit. Lorsque le FVIII était pré-incubé avec KM33 FabFc^{N297A} son élimination chez la mère était de $0,5 \pm 0,06$ nM/h contre $2,8 \pm 1,1$ nM/h avec KM33 FabFc. Le FVIII est donc moins catabolisé avec KM33 FabFc^{N297A} indépendamment de l'épitope du FabFc. Chaque minute, 30% du volume total sanguin traverse le foie (Jenne & Kubes 2013). Cette donnée explique pourquoi 30 min après l'injection des souris avec nos complexes immuns, une grande partie du FVIII est retrouvée dans le foie. En plus d'exprimer les récepteurs cataboliques du FVIII, les LSEC et les cellules de Kupffer, expriment fortement le FcγRIIb. Chez la souris, 75% des FcγRIIb sont mêmes localisés sur les LSEC (Ganesan et al. 2012). Le foie est un lieu d'internalisation des complexes immuns ; selon la taille des complexes, les macrophages hépatiques ou les LSEC interviennent dans leur clairance. Tandis que les complexes immuns de grandes tailles, comme les bactéries opsonisées, sont éliminés par phagocytose par les macrophages (Kosugi et al. 1992), les LSEC éliminent les complexes formés d'un anticorps et d'un ou deux antigènes via le FcγRIIb (Benacerraf et al. 1959; Johansson et al. 1996). Par ailleurs, la clairance des complexes immuns de petites tailles est inhibée chez des souris FcγRIIb-KO (Ganesan et al. 2012). Nous pouvons donc supposer qu'en plus des récepteurs d'endocytose du FVIII, les FcγRIIb sont impliqués dans le catabolisme du FVIII lorsqu'il est pré-incubé avec un FabFc, et que l'insertion d'une mutation abrogeant la fixation du Fc aux FcγRs permet de limiter cette élimination, et ainsi favoriser le passage transplacentaire.

I - 9 - Impact de la quantité de FVIII et de FabFc sur le transfert transplacentaire

Au cours de mes expériences, j'ai également conclu que la quantité de FVIII et de FabFcs influait sur le transfert transplacentaire. En effet, lorsque nous traitons les femelles gestantes FVIII-KO avec un bolus de FVIII (50 µg), nous obtenons une concentration plasmatique de 150 nM de FVIII à 5 min, soit 30 fois plus que la concentration moyenne de FVIII circulant chez la femme enceinte et 150 fois plus que chez la femme enceinte conductrice d'hémophilie A (Leebeek et al. 2020), et détectons un transfert transplacentaire. À l'inverse, dans le modèle de souris exprimant le FVIII de manière endogène, environ $4,1 \pm 1,9$ nM de FVIII était en circulation chez les femelles gestantes soit une concentration presque équivalente à celle retrouvée chez les femmes enceintes. Le transfert transplacentaire de FVIII

DISCUSSION

est pourtant marginal dans ce modèle, ce qui souligne l'importance de la concentration en FVIII. Toujours au sein du même modèle pré-clinique, j'ai démontré que la quantité de FabFc injectée aux femelles gestantes impactait également le transfert transplacentaire.

Les FabFcs persistants en circulation pendant au moins 8 jours, et le transfert transplacentaire d'IgGs maternelles débutant à E15 chez les rongeurs (Appleby & Catty 1983), j'ai également testé si nous pouvions maximiser le passage du FVIII exprimé de manière endogène par les souris gestantes traitées aux AAV en les injectant dès le 15^{ème} jour de gestation jusqu'à E17.5. Néanmoins, je n'ai pas vu de différence de transfert. J'aurai pu cependant tester le transfert transplacentaire en traitant les souris chaque jour de E15.5 à E17.5 avec les FabFcs et ainsi déterminer si nous pouvions augmenter le transfert (et favoriser ensuite l'induction de tolérance).

Pour conclure sur cette partie, le transfert transplacentaire de FVIII, une molécule de haute promiscuité moléculaire, est un processus complexe freiné par plusieurs paramètres. Néanmoins mon travail apporte la preuve de concept qu'il est possible de faire traverser des protéines exogènes ou endogènes de la circulation maternelle à la circulation foétale.

II - Absence d'induction de tolérance

Nous étions parvenus il y a plusieurs années à induire une tolérance envers le FVIII thérapeutique chez des souris FVIII-KO après le transfert transplacentaire des domaines A2 et C2 fusionnés au Fc γ 1 murin (Gupta et al. 2015). Malgré la validation du transfert transplacentaire au sein du modèle FVIII-KO et au sein du modèle de souris exprimant le FVIII humain endogène, je ne suis pas parvenue à induire une tolérance immunitaire envers le FVIII thérapeutique. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées quant à l'absence d'induction de tolérance dans ces modèles de souris. La première tient compte du passage 30 fois plus faible du FVIII BDD que des C2Fc murin et humain. En effet, la quantité de protéine introduite par les FabFcs dans la circulation foétale est peut-être trop faible pour permettre son internalisation par les cellules présentatrices et sa présentation aux LT en maturation.

La seconde hypothèse pouvant expliquer l'absence de mise en place de tolérance dans le modèle pré-clinique d'hémophilie A est l'inhibition de l'endocytose du FVIII par les cellules présentatrices d'antigènes et l'absence de présentation des peptides issus du FVIII aux lymphocytes T. En effet, comme mentionné plus tôt, les domaines C1 et C2 sont impliqués dans l'endocytose du FVIII par les cellules présentatrices d'antigènes (Gangadharan et al.

DISCUSSION

2017; Wroblewska et al. 2012), et KM33 et BO2C11 inhibent l'endocytose du FVIII par des cellules dendritiques dérivées de monocytes humaines et des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse de souris (Gangadharan et al. 2017; Herczenik et al. 2012). En confirmation de ces observations, j'ai démontré que les splénocytes de souris SUREL1 stimulés avec du FVIII pré-incubé avec KM33 FabFc n'activaient pas le thymocyte spécifique du FVIII. Il est probable que l'absence de stimulation des LT est la conséquence de l'inhibition de l'endocytose du FVIII par les CPA lorsqu'il est complexé à KM33. La présence du FabFc altère donc peut-être la présentation du FVIII lors de l'ontogénie des lymphocytes T.

Après avoir constaté l'absence de mise en place de tolérance à l'aide des FabFc, nous avons souhaité confirmer que nous parvenions toujours à induire la tolérance lorsque les souris gestantes FVIII-KO étaient traitées avec du C2Fc. Au vu des difficultés de production du C2Fc murin, nous avons réalisé nos expériences avec le C2Fc humain. Malgré un passage transplacentaire identique à celui du C2Fc murin, je n'ai pas été en mesure d'induire une tolérance immunitaire chez la descendance des souris traitées au C2Fc humain. L'impact de la région Fc humaine sur l'induction de tolérance est à mes yeux peu probable pour plusieurs raisons. La première est que nous avons démontré que les Fc humains fixent les Fc γ Rs murins. Ensuite, il est connu que les Fc γ Rs murins ont une haute affinité pour les IgGs humaines (Dekkers Mabs 2017). Enfin, il a été démontré à de nombreux niveaux que les IgGs humaines peuvent activer les cellules de souris via les Fc γ Rs. Cela a par exemple été démontré dans le cadre de la phagocytose, de la toxicité dépendante des anticorps (« l'antibody-dependant cellular cytotoxicity » (ADCC)) ou encore dans l'activation du complément (Overdijk et al. 2012; Saeland et al. 2003).

Le dernier paramètre pouvant impacter l'induction de tolérance est la dérive génétique de notre modèle de souris hémophile A. En effet, peu de temps avant le début de ma thèse, le laboratoire a rétro-croisé les souris FVIII-KO avec des souris C57BL/6 sauvages afin de lutter contre la dérive génétique et de régénérer le modèle.

Je n'ai pas été en mesure de répondre à ces hypothèses au cours de ma thèse mais des expériences supplémentaires d'induction de tolérance avec du C2Fc murin sont en cours. Par ailleurs, nous pourrions apporter une preuve de concept pour l'induction de tolérance à l'aide d'un modèle protéique moins complexe que le FVIII tel que le FIX. En effet, les patients hémophiles B, sont traités avec du FIX recombinant et peuvent développer également des inhibiteurs. Nous avons démontré que le FIXFc traverse le placenta (résultats non publié). Par

DISCUSSION

ailleurs, le FIX est moins complexe, de poids moléculaire moins important, plus abondant dans le plasma, et persiste plus longtemps en circulation que le FVIII (Smith & Gailani 2008). La clairance du FIX médiée par LRP et ASGPR peut être limitée par l'introduction de mutation (Blasko et al. 2013). Nous pourrions donc introduire des mutations inhibant son activation et ainsi défavoriser son catabolisme. Enfin, la génération de FabFc anti-FIX à partir d'anticorps monoclonaux anti-FIX ne devrait présenter aucune difficulté (Frazier et al. 1989).

Nous pourrions également utiliser un FVIII muté au sein des épitopes impliqués dans son catabolisme, et utiliser EL14 ou BOIIB2 qui n'inhibent pas la présentation du FVIII aux LT.

III - Limites du modèle murin pour le passage transplacentaire et l'induction de tolérance

L'utilisation d'un modèle murin pour ce projet était indispensable mais comme tout modèle pré-clinique, ce modèle présente plusieurs biais. Le premier concerne les quantités supra-physiologiques de FVIII injectées, pour induire un passage transplacentaire. En effet, une femme enceinte saine exprime entre 5 et 7 nM de FVIII coagulant et une femme enceinte conductrice d'hémophilie exprime entre 0,8 et 1,1 nM de FVIII coagulant. Lorsque je traite les souris FVIII-KO avec du FVIII j'injecte 150 nM de FVIII. Le modèle de souris FVIII-KO traitées aux AAV-FVIII est un modèle plus proche de la physiologie, avec une expression moyenne de 4 nM de FVIII, mais ne permet que peu de passage transplacentaire.

Par ailleurs, 20% des individus sains développent des IgGs anti-FVIII non inhibitrices (Algiman et al. 1992; Gilles & Saint-Remy 1994; Whelan et al. 2013). Nous pouvons donc supposer les femmes conductrices d'hémophilie A possèdent aussi des IgGs naturelles anti-FVIII. Or le modèle murin est naïf, il ne présente donc aucunes IgGs anti-FVIII lors du transfert transplacentaire. Bien que cela soit peu probable au vu de leur plus faible affinité pour le FVIII que les anticorps inhibiteurs, nous ignorons si la présence d'IgGs non-inhibitrices peuvent impacter le transfert transplacentaire de FVIII.

Le placenta murin est dit hémotrichorial, 3 couches cellulaires séparent donc les circulations fœtale et maternelle contre une seule chez l'humain (Marinello & Patisaul 2021) (Figure 11). Le passage de couches supplémentaires pourrait réduire le transfert transplacentaire chez la souris et de meilleurs résultats pourraient être attendus chez l'humain.

DISCUSSION

Concernant l'induction de tolérance immunitaire, l'immunogénicité du FVIII humain au sein de modèle murin peut également introduire un biais. En effet, l'injection de FVIII humain chez la souris FVIII-KO induit une réponse immunitaire chez 80% des souris contre 30% chez l'Homme. Cette différence entre l'Homme et la souris s'explique par le fait que les souris présentent toutes la même invalidation du gène *F8* et le même CMH, ce qui n'est pas le cas chez l'Homme (Reipert et al. 2000).

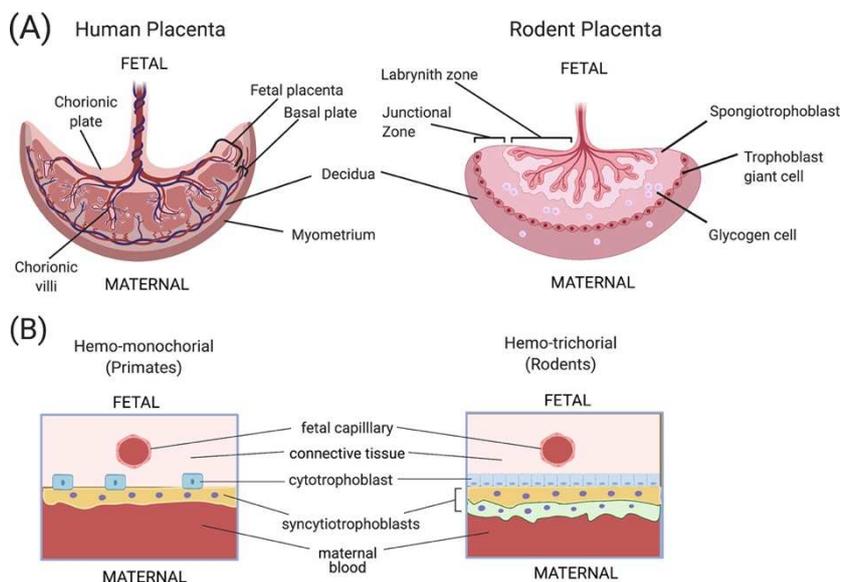


Figure 12 **Organisation des placentas humain hemo-monochorial et murin hemo-trichorial** (Marinello & Patisaul 2021)

IV - Perspectives

En plus des possibilités pour d'augmenter le transfert transplacentaire ou d'apporter une preuve de concept d'induction de tolérance avec une autre protéine, nous pourrions utiliser des nanoparticules (NP) pour emballer le FVIII humain et lui permettre de traverser le placenta vers la circulation fœtale. Les nanoparticules sont des enveloppes constituées de liposomes, de polymers, d'or ou d'argent (Figuerola-Espada et al. 2020). Elles ont déjà été utilisées en essais cliniques pour des traitements contre différents cancers. Les molécules thérapeutiques (anticorps ou petites protéines) sont emballées ou conjuguées en surface des NP (Milling et al. 2017; Riley et al. 2019). La taille importante du FVIII ne serait probablement pas limitante dans l'utilisation de NP. En effet, le FVIII a déjà été intégré dans des nanoparticules dans le cadre de recherche sur l'induction de tolérance dans un modèle pré-clinique de souris hémophiles A adultes (Zhang et al. 2016). Les nanoparticules améliorent la stabilité et protègent des dégradations par les protéases et de la reconnaissance immunitaire (Milling et al. 2017; Mitchell et al. 2017). Dans le cas du FVIII, l'utilisation de NP

DISCUSSION

pourrait à la fois prolonger la demi-vie du FVIII et favoriser son transfert transplacentaire en masquant les épitopes ciblés par les récepteurs cataboliques du FVIII.

Le transfert transplacentaire de nanoparticules a déjà été testé dans plusieurs modèles pré-cliniques (Huang et al. 2015). Ces nanoparticules atteignent la circulation fœtale par transfert passif, transfert actif ou endocytose (Buerki-Thurnherr et al. 2012; Menezes et al. 2011; Wick et al. 2010) et s'accumulent dans les organes du fœtus (Semmler-Behnke et al. 2014). Récemment une nanoparticule de chitosane recouverte d'IgGs a été développée afin d'exploiter le mécanisme de transfert d'IgGs maternelles par le FcRn (Tse et al. 2022). Nous pourrions donc nous aussi générer ce type de NP et empaqueter le FVIII afin d'induire son transfert transplacentaire. Par ailleurs, les NP relarguent leur contenu au cours du temps ou après un stimuli interne ou externe (Mitchell et al. 2017; Weng et al. 2020). Dans notre cas, nous pourrions donc contrôler la libération du FVIII après son transfert transplacentaire et ainsi favoriser son endocytose par les cellules présentatrices d'antigènes ou exploiter le fait que les nanoparticules sont généralement internalisées par les cellules présentatrices d'antigènes (Maldonado et al. 2015; Metcalfe & Fahmy 2012). Néanmoins, de nombreuses mises au point seront nécessaires, le transfert de nanoparticules dépendant de leur charge, de leur composition, de leur taille et pouvant mener au développement de ferro-toxicité chez la mère et le fœtus (Teng et al. 2021, p. 2).

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Abdiche YN, Yeung YA, Chaparro-Riggers J, Barman I, Strop P, et al. 2015. The neonatal Fc receptor (FcRn) binds independently to both sites of the IgG homodimer with identical affinity. *MAbs*. 7(2):331–43

Abou-Donia MB, Suliman HB, Siniscalco D, Antonucci N, ElKafrawy P. 2019. De novo Blood Biomarkers in Autism: Autoantibodies against Neuronal and Glial Proteins. *Behav Sci (Basel)*. 9(5):

Abraham A, Apte S, Shamukhaiah C, N. F, Subramaniam K, et al. 2018. Outcome of Immune Tolerance Induction Using an Extended Half-Life Clotting Factor Concentrate — Recombinant Factor VIII Fc (Eloctate™) — a Report from India. *Blood*. 132:2494

Abrahamson DR, Rodewald R. 1981. Evidence for the sorting of endocytic vesicle contents during the receptor-mediated transport of IgG across the newborn rat intestine. *J. Cell Biol.* 91(1):270–80

Abu-Raya B, Maertens K, Edwards KM, Omer SB, Englund JA, et al. 2020. Global Perspectives on Immunization During Pregnancy and Priorities for Future Research and Development: An International Consensus Statement. *Frontiers in Immunology*. 11:

Acqua WFD, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, et al. 2002. Increasing the Affinity of a Human IgG1 for the Neonatal Fc Receptor: Biological Consequences. *The Journal of Immunology*. 169(9):5171–80

Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, et al. 2002. Interactions between Trophoblast Cells and the Maternal and Fetal Circulation in the Mouse Placenta. *Developmental Biology*. 250(2):358–73

Addis T. 1911. The pathogenesis of hereditary hæmophilia. *J. Pathol.* 15(4):427–52

Ahouse JJ, Hagerman CL, Mittal P, Gilbert DJ, Copeland NG, et al. 1993. Mouse MHC class I-like Fc receptor encoded outside the MHC. *J. Immunol.* 151(11):6076–88

Akilesh S, Christianson GJ, Roopenian DC, Shaw AS. 2007. Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism. *J. Immunol.* 179(7):4580–88

Aledort LM. 2011. Harmonization of clinical trial guidelines for assessing the risk of inhibitor development in hemophilia A treatment. *J Thromb Haemost.* 9(3):423–27

Algiman M, Dietrich G, Nydegger UE, Boieldieu D, Sultan Y, Kazatchkine MD. 1992. Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(9):3795–99

BIBLIOGRAPHIE

- Ali SR, Fong JJ, Carlin AF, Busch TD, Linden R, et al. 2014. Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B Streptococcus. *J Exp Med.* 211(6):1231–42
- Allacher P, Baumgartner CK, Pordes AG, Ahmad RU, Schwarz HP, Reipert BM. 2011. Stimulation and inhibition of FVIII-specific memory B-cell responses by CpG-B (ODN 1826), a ligand for Toll-like receptor 9. *Blood.* 117(1):259–67
- Allen H, Fraser J, Flyer D, Calvin S, Flavell R. 1986. Beta 2-microglobulin is not required for cell surface expression of the murine class I histocompatibility antigen H-2Db or of a truncated H-2Db. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83(19):7447–51
- Alom-Ruiz SP, Anilkumar N, Shah AM. 2008. Reactive oxygen species and endothelial activation. *Antioxid Redox Signal.* 10(6):1089–1100
- Andersen JT, Cameron J, Plumridge A, Evans L, Sleep D, Sandlie I. 2013. Single-chain variable fragment albumin fusions bind the neonatal Fc receptor (FcRn) in a species-dependent manner: implications for in vivo half-life evaluation of albumin fusion therapeutics. *J. Biol. Chem.* 288(33):24277–85
- Andersen JT, Daba MB, Sandlie I. 2010. FcRn binding properties of an abnormal truncated analbuminemic albumin variant. *Clin. Biochem.* 43(4–5):367–72
- Andersen JT, Dalhus B, Cameron J, Daba MB, Plumridge A, et al. 2012. Structure-based mutagenesis reveals the albumin-binding site of the neonatal Fc receptor. *Nat Commun.* 3(1):1–9
- Andersen JT, Dee Qian J, Sandlie I. 2006. The conserved histidine 166 residue of the human neonatal Fc receptor heavy chain is critical for the pH-dependent binding to albumin. *Eur. J. Immunol.* 36(11):3044–51
- André S, Meslier Y, Dimitrov JD, Repessé Y, Kaveri SV, et al. 2009. A cellular viewpoint of anti-FVIII immune response in hemophilia A. *Clin Rev Allergy Immunol.* 37(2):105–13
- Andrews RK, López JA, Berndt MC. 1997. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 29(1):91–105
- Antohe F, Rădulescu L, Gafencu A, Gheție V, Simionescu M. 2001. Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. *Hum. Immunol.* 62(2):93–105
- Antunes SV, Tangada S, Stasyshyn O, Mamonov V, Phillips J, et al. 2014. Randomized comparison of prophylaxis and on-demand regimens with FEIBA NF in the treatment of haemophilia A and B with inhibitors. *Haemophilia.* 20(1):65–72

BIBLIOGRAPHIE

Aplin JD, Myers JE, Timms K, Westwood M. 2020. Tracking placental development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 16(9):479–94

Appleby P, Catty D. 1983. Transmission of immunoglobulin to foetal and neonatal mice. *J. Reprod. Immunol.* 5(4):203–13

Arai M, Inaba H, Higuchi M, Antonarakis SE, Kazazian HH, et al. 1989. Direct characterization of factor VIII in plasma: detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine-372----histidine). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(11):4277–81

Archambault AS, Carrero JA, Barnett LG, McGee NG, Sim J, et al. 2013. Cutting edge: Conditional MHC class II expression reveals a limited role for B cell antigen presentation in primary and secondary CD4 T cell responses. *J Immunol.* 191(2):545–50

Astermark J, Donfield SM, DiMichele DM, Gringeri A, Gilbert SA, et al. 2006a. A randomized comparison of bypassing agents in hemophilia complicated by an inhibitor: the FEIBA NovoSeven Comparative (FENOC) Study. *Blood.* 109(2):546–51

Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED, Schwarz J, Menius ED, et al. 2013. The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood.* 121(8):1446–54

Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, et al. 2006b. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood.* 108(12):3739–45

Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert A-K, MIBS Study Group. 2006c. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood.* 107(8):3167–72

Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Berntorp E, Lefvert A-K, MIBS Study Group. 2007. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 5(2):263–65

Aznar JA, Marco A, Jiménez-Yuste V, Fernández-Fontecha E, Pérez R, et al. 2012. Is on-demand treatment effective in patients with severe haemophilia? *Haemophilia.* 18(5):738–42

Baker K, Qiao S-W, Kuo TT, Aveson VG, Platzer B, et al. 2011. Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates cross-presentation of IgG immune complexes by CD8-CD11b+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(24):9927–32

Baker K, Rath T, Flak MB, Arthur JC, Chen Z, et al. 2013a. Neonatal Fc receptor expression in dendritic cells mediates protective immunity against colorectal cancer. *Immunity.* 39(6):1095–1107

Baker K, Rath T, Lencer WI, Fiebiger E, Blumberg RS. 2013b. Cross-presentation of IgG-containing immune complexes. *Cell. Mol. Life Sci.* 70(8):1319–34

BIBLIOGRAPHIE

- Balfour AH, Jones EA. 1977. The binding of plasma proteins to human placental cell membranes. *Clin Sci Mol Med.* 52(4):383–94
- Bancos S, Baglolle CJ, Rahman I, Phipps RP. 2010. Induction of heme oxygenase-1 in normal and malignant B lymphocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) requires Nrf2. *Cell Immunol.* 262(1):18–27
- Banner DW, D’Arcy A, Chène C, Winkler FK, Guha A, et al. 1996. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature.* 380(6569):41–46
- Barr RD, Saleh M, Furlong W, Horsman J, Sek J, et al. 2002. Health status and health-related quality of life associated with hemophilia. *American Journal of Hematology.* 71(3):152–60
- Barrow RT, Healey JF, Jacquemin MG, Saint-Remy JM, Lollar P. 2001. Antigenicity of putative phospholipid membrane-binding residues in factor VIII. *Blood.* 97(1):169–74
- Barton NW, Brady RO, Dambrosia JM, Di Bisceglie AM, Doppelt SH, et al. 1991. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* 324(21):1464–70
- Barton NW, Furbish FS, Murray GJ, Garfield M, Brady RO. 1990. Therapeutic response to intravenous infusions of glucocerebrosidase in a patient with Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(5):1913–16
- Basford JE, Wancata L, Hofmann SM, Silva RAGD, Davidson WS, et al. 2011. Hepatic Deficiency of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 Reduces High Density Lipoprotein Secretion and Plasma Levels in Mice *. *Journal of Biological Chemistry.* 286(15):13079–87
- Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo M-G. 2005. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood.* 105(12):4743–48
- Bayry J, Triebel F, Kaveri SV, Tough DF. 2007. Human Dendritic Cells Acquire a Semimature Phenotype and Lymph Node Homing Potential through Interaction with CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology.* 178(7):4184–93
- Beckman DA, Koszalka TR, Jensen M, Brent RL. 1990. Experimental manipulation of the rodent visceral yolk sac. *Teratology.* 41(4):395–404
- Behrmann M, Pasi J, Saint-Remy J-MR, Kotitschke R, Kloft M. 2002. Von Willebrand factor modulates factor VIII immunogenicity: comparative study of different factor VIII concentrates in a haemophilia A mouse model. *Thromb Haemost.* 88(2):221–29
- Benacerraf B, Sebastyen M, Cooper NS. 1959. The Clearance of Antigen Antibody Complexes from the Blood by the Reticulo-Endothelial System. *The Journal of Immunology.* 82(2):131–37

BIBLIOGRAPHIE

- Bendixen E, Danielsen M, Larsen K, Bendixen C. 2010. Advances in porcine genomics and proteomics--a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Brief Funct Genomics*. 9(3):208–19
- Benirschke K, Kaufmann P. 1990. Early Development of the Human Placenta. In *Pathology of the Human Placenta*, eds. K Benirschke, P Kaufmann, pp. 13–21. New York, NY: Springer
- Bennett JS. 1990. The molecular biology of platelet membrane proteins. *Semin Hematol*. 27(2):186–204
- Benowitz I, Esposito DB, Gracey KD, Shapiro ED, Vázquez M. 2010. Influenza vaccine given to pregnant women reduces hospitalization due to influenza in their infants. *Clin. Infect. Dis*. 51(12):1355–61
- Berntorp E. 1997. Second generation, B-domain deleted recombinant factor VIII. *Thromb Haemost*. 78(1):256–60
- Berntorp E, Astermark J, Björkman S, Blanchette VS, Fischer K, et al. 2003. Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: summary statement. *Haemophilia*. 9 Suppl 1:1–4
- Berntorp E, Fischer K, Hart DP, Mancuso ME, Stephensen D, et al. 2021. Haemophilia. *Nat Rev Dis Primers*. 7(1):45
- Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH. 1995. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nature Genetics*. 10(1):119
- Bi L, Sarkar R, Naas T, Lawler AM, Pain J, et al. 1996. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood*. 88(9):3446–50
- Biggs R, Douglas AS, Macfarlane RG, Dacie JV, Pitney WR, Merskey null. 1952. Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia. *Br Med J*. 2(4799):1378–82
- Bihoreau N, Paolantonacci P, Bardelle C, Fontaine-Aupart MP, Krishnan S, et al. 1991. Structural and functional characterization of Factor VIII-delta II, a new recombinant Factor VIII lacking most of the B-domain. *Biochem J*. 277 (Pt 1):23–31
- Bijsterbosch MK, Klaus GG. 1985. Crosslinking of surface immunoglobulin and Fc receptors on B lymphocytes inhibits stimulation of inositol phospholipid breakdown via the antigen receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 162(6):1825–36
- BioMarin Pharmaceutical. 2022. A Phase 3 Open-Label, Single-Arm Study To Evaluate The Efficacy and Safety of BMN 270, an Adeno-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer of Human Factor VIII in Hemophilia A Patients With Residual FVIII Levels ≤ 1 IU/dL Receiving Prophylactic FVIII Infusions. *NCT03370913*, clinicaltrials.gov

BIBLIOGRAPHIE

Biswas M, Rogers GL, Sherman A, Byrne BJ, Markusic DM, et al. 2017. Combination therapy for inhibitor reversal in haemophilia A using monoclonal anti-CD20 and rapamycin. *Thromb Haemost.* 117(1):33–43

Biswas M, Sarkar D, Kumar SRP, Nayak S, Rogers GL, et al. 2015. Synergy between rapamycin and FLT3 ligand enhances plasmacytoid dendritic cell-dependent induction of CD4+CD25+FoxP3+ Treg. *Blood.* 125(19):2937–47

Björkman S, Folkesson A, Jönsson S. 2009. Pharmacokinetics and dose requirements of factor VIII over the age range 3-74 years: a population analysis based on 50 patients with long-term prophylactic treatment for haemophilia A. *Eur J Clin Pharmacol.* 65(10):989–98

Björkman S, Oh M, Spotts G, Schroth P, Fritsch S, et al. 2012. Population pharmacokinetics of recombinant factor VIII: the relationships of pharmacokinetics to age and body weight. *Blood.* 119(2):612–18

Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, Manco-Johnson MJ, van den Berg HM, et al. 2014. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 12(11):1935–39

Blasko E, Brooks AR, Ho E, Wu JM, Zhao X-Y, Subramanyam B. 2013. Hepatocyte clearance and pharmacokinetics of recombinant factor IX glycosylation variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 440(4):485–89

Bloem E, Karpf DM, Nørby PL, Johansen PB, Loftager M, et al. 2019. Factor VIII with a 237 amino acid B-domain has an extended half-life in F8-knockout mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 17(2):350–60

Blumberg LJ, Humphries JE, Jones SD, Pearce LB, Holgate R, et al. 2019. Blocking FcRn in humans reduces circulating IgG levels and inhibits IgG immune complex-mediated immune responses. *Sci Adv.* 5(12):eaax9586

Blumberg RS, Koss T, Story CM, Barisani D, Polischuk J, et al. 1995. A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.* 95(5):2397–2402

Board PG, Losowsky MS, Miloszewski KJ. 1993. Factor XIII: inherited and acquired deficiency. *Blood Rev.* 7(4):229–42

Bom VJ, Bertina RM. 1990. The contributions of Ca²⁺, phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem J.* 265(2):327–36

Bombeli T, Spahn DR. 2004. Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. *BJA: British Journal of Anaesthesia.* 93(2):275–87

BIBLIOGRAPHIE

- Bon C, Hofer T, Bousquet-Mélou A, Davies MR, Krippendorff B-F. 2017. Capacity limits of asialoglycoprotein receptor-mediated liver targeting. *MAbs*. 9(8):1360–69
- Bontempo F, Lewis J, Gorenc T, Spero J, Ragni M, et al. 1987. Liver transplantation in hemophilia A. *Blood*. 69(6):1721–24
- Booth BJ, Ramakrishnan B, Narayan K, Wollacott AM, Babcock GJ, et al. 2018. Extending human IgG half-life using structure-guided design. *MAbs*. 10(7):1098–1110
- Booth CJ, Brooks MB, Rockwell S. 2010a. Spontaneous coagulopathy in inbred WAG/RijYcb rats. *Comp Med*. 60(1):25–30
- Booth CJ, Brooks MB, Rockwell S, Murphy JW, Rinder HM, et al. 2010b. WAG-F8(m1Ycb) rats harboring a factor VIII gene mutation provide a new animal model for hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 8(11):2472–77
- Borghi S, Bournazos S, Thulin NK, Li C, Gajewski A, et al. 2020. FcRn, but not FcγRs, drives maternal-fetal transplacental transport of human IgG antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117(23):12943–51
- Borvak J, Richardson J, Medesan C, Antohe F, Radu C, et al. 1998. Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int. Immunol*. 10(9):1289–98
- Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, et al. 1996. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*. 43(4):456–63
- Bovenschen N, Boertjes RC, Stempvoort G van, Voorberg J, Lenting PJ, et al. 2003a. Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein and Factor IXa Share Structural Requirements for Binding to the A3 Domain of Coagulation Factor VIII *. *Journal of Biological Chemistry*. 278(11):9370–77
- Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, et al. 2003b. Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. *Blood*. 101(10):3933–39
- Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJM, Mertens K. 2005. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost*. 3(6):1257–65
- Brambell FW. 1966. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet*. 2(7473):1087–93
- Brambell FW. 1969. The transmission of immune globulins from the mother to the foetal and newborn young. *Proc Nutr Soc*. 28(1):35–41

BIBLIOGRAPHIE

Brambell FW, Hemmings WA, Morris IG. 1964. A THEORETICAL MODEL OF GAMMA-GLOBULIN CATABOLISM. *Nature*. 203:1352–54

Braun J, Te W, S I, G A, J H. 1996. The major subunit of the asialoglycoprotein receptor is expressed on the hepatocellular surface in mice lacking the minor receptor subunit. *The Journal of biological chemistry*. 271(35):

Bravo MI, Pérez A, Raventós A, Grancha S, Jorquera JI, et al. 2022. Plasma-derived FVIII/VWF complex shows higher protection against inhibitors than isolated FVIII after infusion in haemophilic patients: A translational study. *Haemophilia*

Bray GL, Kroner BL, Arkin S, Aledort LW, Hilgartner MW, et al. 1993. Loss of high-responder inhibitors in patients with severe hemophilia A and human immunodeficiency virus type 1 infection: a report from the Multi-Center Hemophilia Cohort Study. *Am. J. Hematol.* 42(4):375–79

Bril V, Benatar M, Andersen H, Vissing J, Brock M, et al. 2021. Efficacy and Safety of Rozanolixizumab in Moderate to Severe Generalized Myasthenia Gravis: A Phase 2 Randomized Control Trial. *Neurology*. 96(6):e853–65

Brinkhous KM, Graham JB. 1950. Hemophilia in the female dog. *Science*. 111(2896):723–24

Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyssen L, Romero R. 2011. The “great obstetrical syndromes” are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol*. 204(3):193–201

Brucato A, Cimaz R, Caporali R, Ramoni V, Buyon J. 2011. Pregnancy outcomes in patients with autoimmune diseases and anti-Ro/SSA antibodies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 40(1):27–41

Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, et al. 2009. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 113(16):3716–25

Brydun A, Watari Y, Yamamoto Y, Okuhara K, Teragawa H, et al. 2007. Reduced expression of heme oxygenase-1 in patients with coronary atherosclerosis. *Hypertens Res*. 30(4):341–48

Buerki-Thurnherr T, Mandach U von, Wick P. 2012. Knocking at the door of the unborn child: engineered nanoparticles at the human placental barrier. *Swiss Medical Weekly*. (13):

Bundhoo A, Paveglio S, Rafti E, Dhongade A, Blumberg RS, Matson AP. 2015. Evidence that FcRn mediates the transplacental passage of maternal IgE in the form of IgG anti-IgE/IgE immune complexes. *Clin. Exp. Allergy*. 45(6):1085–98

Buranahirun C, Walsh KS, Mrakotsky C, Croteau SE, Rajpurkar M, et al. 2020. Neuropsychological function in children with hemophilia: A review of the Hemophilia Growth and Development Study and introduction of the current eTHINK study. *Pediatric Blood & Cancer*. 67(1):e28004

BIBLIOGRAPHIE

- Burdin N, Van Kooten C, Galibert L, Abrams JS, Wijdenes J, et al. 1995. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes. *J Immunol.* 154(6):2533–44
- Burmeister WP, Gastinel LN, Simister NE, Blum ML, Bjorkman PJ. 1994a. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. *Nature.* 372(6504):336–43
- Burmeister WP, Huber AH, Bjorkman PJ. 1994b. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature.* 372(6504):379–83
- Burrows RF, Kelton JG. 1993. Fetal thrombocytopenia and its relation to maternal thrombocytopenia. *N. Engl. J. Med.* 329(20):1463–66
- Burton GJ, Jauniaux E, Watson AL. 1999. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. *Am J Obstet Gynecol.* 181(3):718–24
- Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(6):2954–59
- Bussel JB, Zacharoulis S, Kramer K, McFarland JG, Pauliny J, Kaplan C. 2005. Clinical and diagnostic comparison of neonatal alloimmune thrombocytopenia to non-immune cases of thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer.* 45(2):176–83
- Büttel IC, Chamberlain P, Chowers Y, Ehmann F, Greinacher A, et al. 2011. Taking immunogenicity assessment of therapeutic proteins to the next level. *Biologicals.* 39(2):100–109
- Buyon JP, Clancy RM. 2003. From antibody insult to fibrosis in neonatal lupus - the heart of the matter. *Arthritis Res Ther.* 5(6):266–70
- Caliceti P, Veronese FM. 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev.* 55(10):1261–77
- Calvez T, Chambost H, d'Oiron R, Dalibard V, Demiguel V, et al. 2018. Analyses of the FranceCoag cohort support differences in immunogenicity among one plasma-derived and two recombinant factor VIII brands in boys with severe hemophilia A. *Haematologica.* 103(1):179–89
- Canis K, Anzengruber J, Garenaux E, Feichtinger M, Benamara K, et al. 2018. In-depth comparison of N-glycosylation of human plasma-derived factor VIII and different recombinant products: from structure to clinical implications. *J Thromb Haemost*
- Cannavò A, Valsecchi C, Garagiola I, Palla R, Mannucci PM, et al. 2017. Nonneutralizing antibodies against factor VIII and risk of inhibitor development in severe hemophilia A. *Blood.* 129(10):1245–50

BIBLIOGRAPHIE

- Cao C, Pressman EK, Cooper EM, Guillet R, Westerman M, O'Brien KO. 2014. Placental heme receptor LRP1 correlates with the heme exporter FLVCR1 and neonatal iron status. *Reproduction*. 148(3):295–302
- Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J, Marsters SA, Gregory T, et al. 1989. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature*. 337(6207):525–31
- Carambia A, Herkel J. 2014. Liver sinusoidal cells collecting MHC-I molecules: You can't get enough of a good thing. *Journal of Hepatology*. 61(3):464–65
- Castaldo G, D'Argenio V, Nardiello P, Zarrilli F, Sanna V, et al. 2007. Haemophilia A: molecular insights. *Clin Chem Lab Med*. 45(4):450–61
- Castaneda DC, Dhommée C, Baranek T, Dalloneau E, Lajoie L, et al. 2018. Lack of FcRn Impairs Natural Killer Cell Development and Functions in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 9:2259
- Cavaco M, Castanho MARB, Neves V. 2018. Peptibodies: An elegant solution for a long-standing problem. *Peptide Science*. 110(1):e23095
- Challa DK, Velmurugan R, Ober RJ, Sally Ward E. 2014. FcRn: From Molecular Interactions to Regulation of IgG Pharmacokinetics and Functions. In *Fc Receptors*, eds. M Daeron, F Nimmerjahn, pp. 249–72. Cham: Springer International Publishing
- Challa DK, Wang X, Montoyo HP, Velmurugan R, Ober RJ, Ward ES. 2019. Neonatal Fc receptor expression in macrophages is indispensable for IgG homeostasis. *MAbs*. 11(5):848–60
- Chaparro-Riggers J, Liang H, DeVay RM, Bai L, Sutton JE, et al. 2012. Increasing serum half-life and extending cholesterol lowering in vivo by engineering antibody with pH-sensitive binding to PCSK9. *J Biol Chem*. 287(14):11090–97
- Chaves DG, Velloso-Rodrigues C, Oliveira CA, Teixeira-Carvalho A, Santoro MM, Martins-Filho OA. 2010. A shift towards a T cell cytokine deficiency along with an anti-inflammatory/regulatory microenvironment may enable the synthesis of anti-FVIII inhibitors in haemophilia A patients. *Clin Exp Immunol*. 162(3):425–37
- Chen Y, Qiao J, Tan W, Lu Y, Qin S, et al. 2009. Characterization of porcine factor VII, X and comparison with human factor VII, X. *Blood Cells Mol Dis*. 43(1):111–18
- Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, et al. 2003. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med*. 9(3):338–42
- Chowdary P, Lethagen S, Friedrich U, Brand B, Hay C, et al. 2015. Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and patients with hemophilia: a randomized first human dose trial. *J Thromb. Haemost*. 13(5):743–54

BIBLIOGRAPHIE

Church WR, Jernigan RL, Toole J, Hewick RM, Knopf J, et al. 1984. Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 81(22):6934–37

Cianga P, Medesan C, Richardson JA, Ghetie V, Ward ES. 1999. Identification and function of neonatal Fc receptor in mammary gland of lactating mice. *Eur. J. Immunol*. 29(8):2515–23

Clancy RM, Alvarez D, Komissarova E, Barrat FJ, Swartz J, Buyon JP. 2010. Ro60-associated single-stranded RNA links inflammation with fetal cardiac fibrosis via ligation of TLRs: a novel pathway to autoimmune-associated heart block. *J. Immunol*. 184(4):2148–55

Clements T, Rice TF, Vamvakas G, Barnett S, Barnes M, et al. 2020. Update on Transplacental Transfer of IgG Subclasses: Impact of Maternal and Fetal Factors. *Front Immunol*. 11:1920

Colowick AB, Bohn RL, Avorn J, Ewenstein BM. 2000. Immune tolerance induction in hemophilia patients with inhibitors: costly can be cheaper. *Blood*. 96(5):1698–1702

Constant SL, Bottomly K. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*. 15:297–322

Coppola A, Margaglione M, Santagostino E, Rocino A, Grandone E, et al. 2009. Factor VIII gene (F8) mutations as predictors of outcome in immune tolerance induction of hemophilia A patients with high-responding inhibitors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 7(11):1809–15

Coyle TE, Reding MT, Lin JC, Michaels LA, Shah A, Powell J. 2014. Phase I study of BAY 94-9027, a PEGylated B-domain-deleted recombinant factor VIII with an extended half-life, in subjects with hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 12(4):488–96

Culina S, Gupta N, Boisgard R, Afonso G, Gagnerault M-C, et al. 2015. Materno-Fetal Transfer of Preproinsulin Through the Neonatal Fc Receptor Prevents Autoimmune Diabetes. *Diabetes*. 64(10):3532–42

D'Amici GM, Blasi B, D'Alessandro A, Vaglio S, Zolla L. 2011. Plasma-derived clotting factor VIII: Heterogeneity evaluation in the quest for potential inhibitory-antibody stimulating factors. *ELECTROPHORESIS*. 32(21):2941–50

Darrasse-Jèze G, Marodon G, Salomon BL, Catala M, Klatzmann D. 2005. Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetuses. *Blood*. 105(12):4715–21

Das S. 2019. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn. *Blood Groups*

Dasgupta S, Navarrete AM, André S, Wootla B, Delignat S, et al. 2008. Factor VIII bypasses CD91/LRP for endocytosis by dendritic cells leading to T-cell activation. *Haematologica*. 93(1):83–89

BIBLIOGRAPHIE

Dasgupta S, Navarrete A-M, Bayry J, Delignat S, Wootla B, et al. 2007a. A role for exposed mannositations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(21):8965–70

Dasgupta S, Repessé Y, Bayry J, Navarrete A-M, Wootla B, et al. 2007b. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood.* 109(2):610–12

De Cristofaro R, Sacco M, Lancellotti S, Berruti F, Garagiola I, et al. 2019. Molecular Aggregation of Marketed Recombinant FVIII Products: Biochemical Evidence and Functional Effects. *TH Open.* 3(2):e123–31

de Oliveira Dias JR, de Andrade GC, Novais EA, Farah ME, Rodrigues EB. 2016. Fusion proteins for treatment of retinal diseases: aflibercept, ziv-aflibercept, and conbercept. *Int J Retin Vitr.* 2(1):3

Deisenhofer J. 1981. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry.* 20(9):2361–70

Delignat S, Dasgupta S, André S, Navarrete A-M, Kaveri SV, et al. 2007. Comparison of the immunogenicity of different therapeutic preparations of human factor VIII in the murine model of hemophilia A. *Haematologica.* 92(10):1423–26

Delignat S, Rayes J, Dasgupta S, Gangadharan B, Denis CV, et al. 2020. Removal of Mannose-Ending Glycan at Asn2118 Abrogates FVIII Presentation by Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology.* 11:

Delignat S, Repessé Y, Gilardin L, Dimitrov JD, Lone YC, et al. 2014. Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemophilia.* 20(4):486–92

Delignat S, Russick J, Gangadharan B, Rayes J, Ing M, et al. 2019. Prevention of the anti-factor VIII memory B-cell response by inhibition of Bruton tyrosine kinase in experimental hemophilia A. *Haematologica.* 104(5):1046–54

Devanaboyina SC, Lynch SM, Ober RJ, Ram S, Kim D, et al. 2013. The effect of pH dependence of antibody-antigen interactions on subcellular trafficking dynamics. *mAbs.* 5(6):851–59

Diaz-Frias J, Badri T. 2020. Neonatal Lupus Erythematosus. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Dickinson BL, Badizadegan K, Wu Z, Ahouse JC, Zhu X, et al. 1999. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J. Clin. Invest.* 104(7):903–11

BIBLIOGRAPHIE

Dietrich G, Algiman M, Sultan Y, Nydegger UE, Kazatchkine MD. 1992. Origin of anti-idiotypic activity against anti-factor VIII autoantibodies in pools of normal human immunoglobulin G (IVIg). *Blood*. 79(11):2946–51

Dimichele DM, Hoots WK, Pipe SW, Rivard GE, Santagostino E. 2007. International workshop on immune tolerance induction: consensus recommendations1. *Haemophilia*. 13(s1):1–22

Dimitrov JD, Dasgupta S, Navarrete A-M, Delignat S, Repesse Y, et al. 2010. Induction of heme oxygenase-1 in factor VIII-deficient mice reduces the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood*. 115(13):2682–85

Dimitrov JD, Roumenina LT, Andre S, Repesse Y, Atanasov BP, et al. 2009. Kinetics and thermodynamics of interaction of coagulation factor VIII with a pathogenic human antibody. *Molecular Immunology*. 47(2):290–97

Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ. 1987. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol*. 105(6 Pt 1):2665–74

Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. 1989. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 264(34):20602–7

Doshi BS, Rana J, Castaman G, Shaheen MA, Kaczmarek R, et al. 2021. B cell-activating factor modulates the factor VIII immune response in hemophilia A. *J Clin Invest*. 131(8):

Du LM, Nurden P, Nurden AT, Nichols TC, Bellinger DA, et al. 2013. Platelet-targeted gene therapy with human factor VIII establishes haemostasis in dogs with haemophilia A. *Nat Commun*. 4:2773

Dumont JA, Liu T, Low SC, Zhang X, Kamphaus G, et al. 2012. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. *Blood*. 119(13):3024–30

Duttaroy A, Kanakaraj P, Osborn BL, Schneider H, Pickeral OK, et al. 2005. Development of a long-acting insulin analog using albumin fusion technology. *Diabetes*. 54(1):251–58

Earnshaw SR, Graham CN, McDade CL, Spears JB, Kessler CM. 2015. Factor VIII alloantibody inhibitors: cost analysis of immune tolerance induction vs. prophylaxis and on-demand with bypass treatment. *Haemophilia*. 21(3):310–19

Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. 1986. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*. 25(2):505–12

BIBLIOGRAPHIE

Eichler H, Angchaisuksiri P, Kavakli K, Knoebl P, Windyga J, et al. 2019. Concizumab restores thrombin generation potential in patients with haemophilia: Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling results of concizumab phase 1/1b data. *Haemophilia*. 25(1):60–66

Ellery PM, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. 2009. Evidence for transcriptional activity in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *Placenta*. 30(4):329–34

Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*. 286(5446):1882–88

Ellinger I, Schwab M, Stefanescu A, Hunziker W, Fuchs R. 1999. IgG transport across trophoblast-derived BeWo cells: a model system to study IgG transport in the placenta. *Eur. J. Immunol.* 29(3):733–44

Encyclographie des sciences médicales. Répertoire général de ces sciences, au XIXe siècle. 1835. Etablissement encyclographique

Englund JA, Glezen WP, Turner C, Harvey J, Thompson C, Siber GR. 1995. Transplacental antibody transfer following maternal immunization with polysaccharide and conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccines. *J. Infect. Dis.* 171(1):99–105

Ettinger RA, James EA, Kwok WW, Thompson AR, Pratt KP. 2009. Lineages of human T-cell clones, including T helper 17/T helper 1 cells, isolated at different stages of anti-factor VIII immune responses. *Blood*. 114(7):1423–28

Ettinger RA, James EA, Kwok WW, Thompson AR, Pratt KP. 2010. HLA-DR-restricted T-cell responses to factor VIII epitopes in a mild haemophilia A family with missense substitution A2201P. *Haemophilia*. 16(102):44–55

Ettinger RA, Paz P, James EA, Gunasekera D, Aswad F, et al. 2016. T cells from hemophilia A subjects recognize the same HLA-restricted FVIII epitope with a narrow TCR repertoire. *Blood*. 128(16):2043–54

Everett LA, Cleuren ACA, Khoriaty RN, Ginsburg D. 2014. Murine coagulation factor VIII is synthesized in endothelial cells. *Blood*. 123(24):3697–3705

Ewenstein BM, Hoots WK, Lusher JM, DiMichele D, White GC, et al. 2000. Inhibition of CD40 ligand (CD154) in the treatment of factor VIII inhibitors. *Haematologica*. 85(10 Suppl):35–39

Ewing N, Escuriola-Ettingshausen C, Kreuz W. 2015. Prophylaxis with FEIBA in paediatric patients with haemophilia A and inhibitors. *Haemophilia*. 21(3):358–64

Fahs SA, Hille MT, Shi Q, Weiler H, Montgomery RR. 2014. A conditional knockout mouse model reveals endothelial cells as the principal and possibly exclusive source of plasma factor VIII. *Blood*. 123(24):3706–13

BIBLIOGRAPHIE

- Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, et al. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* 176(11):6752–61
- Fang J-L, Vanlandingham MM, Beland FA, Felton RP, Maisha MP, et al. 2022. Toxicity of high-molecular-weight polyethylene glycols in Sprague Dawley rats. *Toxicol Lett.* 359:22–30
- Fay PJ. 2004. Activation of factor VIII and mechanisms of cofactor action. *Blood Reviews.* 18(1):1–15
- Fay PJ, Beattie T, Huggins CF, Regan LM. 1994. Factor VIIIa A2 subunit residues 558-565 represent a factor IXa interactive site. *Journal of Biological Chemistry.* 269(32):20522–27
- Fay PJ, Coumans JV, Walker FJ. 1991a. von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalyzed inactivation. *Journal of Biological Chemistry.* 266(4):2172–77
- Fay PJ, Smudzin TM, Walker FJ. 1991b. Activated protein C-catalyzed inactivation of human factor VIII and factor VIIIa. Identification of cleavage sites and correlation of proteolysis with cofactor activity. *J Biol Chem.* 266(30):20139–45
- Ferrándiz ML, Devesa I. 2008. Inducers of heme oxygenase-1. *Curr Pharm Des.* 14(5):473–86
- Ferrière S, Peyron I, Christophe OD, Kawecki C, Casari C, et al. 2020. A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood.* 136(6):740–48
- Figuroa-Espada CG, Hofbauer S, Mitchell MJ, Riley RS. 2020. Exploiting the placenta for nanoparticle-mediated drug delivery during pregnancy. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 160:244–61
- Fijnvandraat K, Celie PH, Turenhout EA, ten Cate JW, van Mourik JA, et al. 1998. A human alloantibody interferes with binding of factor IXa to the factor VIII light chain. *Blood.* 91(7):2347–52
- Fijnvandraat K, Peters M, ten Cate JW. 1995. Inter-individual variation in half-life of infused recombinant factor VIII is related to pre-infusion von Willebrand factor antigen levels. *Br J Haematol.* 91(2):474–76
- Finkelman FD, Madden KB, Morris SC, Holmes JM, Boiani N, et al. 1993. Anti-cytokine antibodies as carrier proteins. Prolongation of in vivo effects of exogenous cytokines by injection of cytokine-anti-cytokine antibody complexes. *J Immunol.* 151(3):1235–44
- Finn JD, Ozelo MC, Sabatino DE, Franck HWG, Merricks EP, et al. 2010. Eradication of neutralizing antibodies to factor VIII in canine hemophilia A after liver gene therapy. *Blood.* 116(26):5842–48

BIBLIOGRAPHIE

- Firan M, Bawdon R, Radu C, Ober RJ, Eaken D, et al. 2001. The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gamma-globulin in humans. *Int. Immunol.* 13(8):993–1002
- Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Faulkner L, Raut S, Gupta S. 2008. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest.* 118(3):935–45
- Follenzi A, Raut S, Merlin S, Sarkar R, Gupta S. 2012. Role of bone marrow transplantation for correcting hemophilia A in mice. *Blood.* 119(23):5532–42
- Forsyth K, Plotkin S, Tan T, Wirsing von König CH. 2015. Strategies to decrease pertussis transmission to infants. *Pediatrics.* 135(6):e1475-1482
- Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS. 1990. A synthetic factor VIII peptide of eight amino acid residues (1677-1684) contains the binding region of an anti-factor VIII antibody which inhibits the binding of factor VIII to von Willebrand factor. *Thromb Haemost.* 63(3):403–6
- Franchini M, Mannucci PM. 2017. Modifiers of clinical phenotype in severe congenital hemophilia. *Thromb Res.* 156:60–64
- Franchini M, Montagnana M, Targher G, Veneri D, Zaffanello M, et al. 2009. Interpatient phenotypic inconsistency in severe congenital hemophilia: a systematic review of the role of inherited thrombophilia. *Semin Thromb Hemost.* 35(3):307–12
- Frazier D, Smith K, Cheung W, Ware J, Lin S, et al. 1989. Mapping of monoclonal antibodies to human factor IX. *Blood.* 74(3):971–77
- Fritzing DC, Hew BE, Thorne M, Pangburn MK, Janssen BJC, et al. 2009. Functional characterization of human C3/cobra venom factor hybrid proteins for therapeutic complement depletion. *Dev Comp Immunol.* 33(1):105–16
- Fu C, Lu L, Wu H, Shaman J, Cao Y, et al. 2016. Placental antibody transfer efficiency and maternal levels: specific for measles, coxsackievirus A16, enterovirus 71, poliomyelitis I-III and HIV-1 antibodies. *Sci Rep.* 6:38874
- Fukuzawa T, Sampei Z, Haraya K, Ruike Y, Shida-Kawazoe M, et al. 2017. Long lasting neutralization of C5 by SKY59, a novel recycling antibody, is a potential therapy for complement-mediated diseases. *Sci Rep.* 7:1080
- Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Roberts JR, Kasper CK, Zimmerman TS. 1985. Localization of human factor FVIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82(22):7728–32
- Fulcher CA, de Graaf Mahoney S, Zimmerman TS. 1987. FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood.* 69(5):1475–80

BIBLIOGRAPHIE

Fusaro AE, Brito CA, Victor JR, Rigato PO, Goldoni AL, et al. 2007. Maternal-fetal interaction: preconception immunization in mice prevents neonatal sensitization induced by allergen exposure during pregnancy and breastfeeding. *Immunology*. 122(1):107–15

Gage BK, Merlin S, Olgasi C, Follenzi A, Keller GM. 2022. Therapeutic correction of hemophilia A by transplantation of hPSC-derived liver sinusoidal endothelial cell progenitors. *Cell Reports*. 39(1):

Ganesan LP, Kim J, Wu Y, Mohanty S, Phillips GS, et al. 2012. FcγRIIb on liver sinusoidal endothelium clears small immune complexes. *J Immunol*. 189(10):4981–88

Gangadharan B, Ing M, Delignat S, Peyron I, Teyssandier M, et al. 2017. The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells. *Haematologica*. 102(2):271–81

Gans H, DeHovitz R, Forghani B, Beeler J, Maldonado Y, Arvin AM. 2003. Measles and mumps vaccination as a model to investigate the developing immune system: passive and active immunity during the first year of life. *Vaccine*. 21(24):3398–3405

Georgescu MT, Lai JD, Hough C, Lillicrap D. 2016. War and peace: Factor VIII and the adaptive immune response. *Cell Immunol*. 301:2–7

Georgescu MT, Moorehead PC, Liu T, Dumont J, Scott DW, et al. 2020. Recombinant Factor VIII Fc Inhibits B Cell Activation via Engagement of the FcγRIIB Receptor. *Front Immunol*. 11:138

Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, Tsen MF, Lee Y, Ward ES. 1996. Abnormally short serum half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Eur. J. Immunol*. 26(3):690–96

Giles AR, Tinlin S, Greenwood R. 1982. A canine model of hemophilic (factor VIII:C deficiency) bleeding. *Blood*. 60(3):727–30

Gilhus NE. 2020. Myasthenia Gravis Can Have Consequences for Pregnancy and the Developing Child. *Front Neurol*. 11:554

Gill RK, Mahmood S, Sodhi CP, Nagpaul JP, Mahmood A. 1999. IgG binding and expression of its receptor in rat intestine during postnatal development. *Indian J. Biochem. Biophys*. 36(4):252–57

Gilles JG, Desqueper B, Lenk H, Vermynen J, Saint-Remy JM. 1996. Neutralizing antiidiotypic antibodies to factor VIII inhibitors after desensitization in patients with hemophilia A. *J Clin Invest*. 97(6):1382–88

Gilles JG, Lavend'homme R, Jacquemin M, Peerlinck K, Vermynen J, Saint-Remy J-M. 1998. Anti-factor VIII antibodies belonging to the IgA1 isotype in a mild haemophilia A patient. *International Congress of the World Federation of Hemophilia*. <https://lirias.kuleuven.be/1776040>

BIBLIOGRAPHIE

- Gilles JG, Saint-Remy JM. 1994. Healthy subjects produce both anti-factor VIII and specific anti-idiotypic antibodies. *J Clin Invest.* 94(4):1496–1505
- Gilles JGG, Grailly SC, Maeyer MD, Jacquemin MG, VanderElst LP, Saint-Remy J-MR. 2004. In vivo neutralization of a C2 domain-specific human anti-Factor VIII inhibitor by an anti-idiotypic antibody. *Blood.* 103(7):2617–23
- Gitlin D, Boesman M. 1966. Serum alpha-fetoprotein, albumin, and gamma-G-globulin in the human conceptus. *J. Clin. Invest.* 45(11):1826–38
- Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, et al. 1984. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature.* 312(5992):326–30
- Goh JB, Ng SK. 2018. Impact of host cell line choice on glycan profile. *Crit Rev Biotechnol.* 38(6):851–67
- Gonzalez-Duque S, Azoury ME, Colli ML, Afonso G, Turatsinze J-V, et al. 2018. Conventional and Neo-antigenic Peptides Presented by β Cells Are Targeted by Circulating Naïve CD8+ T Cells in Type 1 Diabetic and Healthy Donors. *Cell Metab.* 28(6):946-960.e6
- Goodeve AC, Williams I, Bray GL, Peake IR. 2000. Relationship between factor VIII mutation type and inhibitor development in a cohort of previously untreated patients treated with recombinant factor VIII (Recombinate). Recombinate PUP Study Group. *Thromb Haemost.* 83(6):844–48
- Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Lambert T, et al. 2006. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood.* 107(1):46–51
- Gouw SC, van den Berg HM, Fischer K, Auerswald G, Carcao M, et al. 2013a. Intensity of factor VIII treatment and inhibitor development in children with severe hemophilia A: the RODIN study. *Blood.* 121(20):4046–55
- Gouw SC, van den Berg HM, le Cessie S, van der Bom JG. 2007. Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 5(7):1383–90
- Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J, Astermark J, de Groot PG, et al. 2012. F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: systematic review and meta-analysis. *Blood.* 119(12):2922–34
- Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, Escuriola C, Cid AR, et al. 2013b. Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *N Engl J Med.* 368(3):231–39
- Graham JB, Buckwalter JA. 1949. Canine hemophilia; observations on the course, the clotting anomaly, and the effect of blood transfusions. *J Exp Med.* 90(2):97–111

BIBLIOGRAPHIE

Graw J, Brackmann H-H, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. 2005. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat. Rev. Genet.* 6(6):488–501

Gregg AR, Weiner CP. 1993. “Normal” umbilical arterial and venous acid-base and blood gas values. *Clin Obstet Gynecol.* 36(1):24–32

Gregory GA, Robinson TIG, Linklater SE, Wang F, Colagiuri S, et al. 2022. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology.* 10(10):741–60

Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM. 2003. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood.* 102(7):2358–63

Groomes CL, Gianferante DM, Crouch GD, Parekh DS, Scott DW, Lieuw K. 2016. Reduction of Factor VIII Inhibitor Titers During Immune Tolerance Induction With Recombinant Factor VIII-Fc Fusion Protein. *Pediatr Blood Cancer.* 63(5):922–24

Grossman S, Tagliavini LB. 2015. Managing Sjogren’s Syndrome. *Home Healthc Now.* 33(9):487–92

Groth CG, Hathaway WE, Gustafsson A, Geis WP, Putnam CW, et al. 1974. Correction of coagulation in the hemophilic dog by transplantation of lymphatic tissue. *Surgery.* 75(5):725–33

Grubb JH, Vogler C, Sly WS. 2010. New strategies for enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Rejuvenation Res.* 13(2–3):229–36

Grubb JH, Vogler C, Tan Y, Shah GN, MacRae AF, Sly WS. 2008. Infused Fc-tagged beta-glucuronidase crosses the placenta and produces clearance of storage in utero in mucopolysaccharidosis VII mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(24):8375–80

Gruppo RA, Valdez LP, Stout RD. 1992. Induction of immune tolerance in patients with hemophilia A and inhibitors. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 14(1):82–87

Gupta N, Culina S, Meslier Y, Dimitrov J, Arnoult C, et al. 2015. Regulation of immune responses to protein therapeutics by transplacental induction of T cell tolerance. *Sci Transl Med.* 7(275):275ra21

Haeckel A, Appler F, Ariza de Schellenberger A, Schellenberger E. 2016. XTEN as Biological Alternative to PEGylation Allows Complete Expression of a Protease-Activatable Killin-Based Cytostatic. *PLoS One.* 11(6):e0157193

Hakeos WH, Miao H, Sirachainan N, Kemball-Cook G, Saenko EL, et al. 2002. Hemophilia A mutations within the factor VIII A2-A3 subunit interface destabilize factor VIIIa and cause one-stage/two-stage activity discrepancy. *Thromb Haemost.* 88(5):781–87

BIBLIOGRAPHIE

Halliday R. 1955a. Prenatal and postnatal transmission of passive immunity to young rats. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 144(916):427–30

Halliday R. 1955b. The absorption of antibodies from immune sera by the gut of the young rat. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 143(912):408–13

HAMSTeRS - Database Commons. <https://ngdc.cncb.ac.cn>

Han JP, Song DW, Lee JH, Lee GS, Yeom SC. 2021. Novel Severe Hemophilia A Mouse Model with Factor VIII Intron 22 Inversion. *Biology.* 10(8):704

Hansen RJ, Balthasar JP. 2002. Intravenous immunoglobulin mediates an increase in anti-platelet antibody clearance via the FcRn receptor. *Thromb. Haemost.* 88(6):898–99

Harkins Druzgal C, Kizilocak H, Brown J, Sennett M, Young G. 2020. Neutralizing antidrug antibody to emicizumab in a patient with severe hemophilia A with inhibitors: New case with detailed laboratory evaluation. *J Thromb Haemost.* 18(9):2205–8

Harris JM, Martin NE, Modi M. 2001. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 40(7):539–51

Hartholt RB, Wroblewska A, Herczenik E, Peyron I, Ten Brinke A, et al. 2017. Enhanced uptake of blood coagulation factor VIII containing immune complexes by antigen presenting cells. *J Thromb Haemost.* 15(2):329–40

Hassan S, Cannavò A, Gouw SC, Rosendaal FR, van der Bom JG. 2018. Factor VIII products and inhibitor development in previously treated patients with severe or moderately severe hemophilia A: a systematic review. *J Thromb Haemost.* 16(6):1055–68

Hausl C, Ahmad RU, Sasgary M, Doering CB, Lollar P, et al. 2005. High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood.* 106(10):3415–22

Hausl C, Ahmad RU, Schwarz HP, Muchitsch EM, Turecek PL, et al. 2004. Preventing restimulation of memory B cells in hemophilia A: a potential new strategy for the treatment of antibody-dependent immune disorders. *Blood.* 104(1):115–22

Hay CR, Ollier W, Pepper L, Cumming A, Keeney S, et al. 1997. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost.* 77(2):234–37

Hay CRM, DiMichele DM, International Immune Tolerance Study. 2012. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood.* 119(6):1335–44

Healey JF, Lubin IM, Lollar P. 1996. The cDNA and derived amino acid sequence of porcine factor VIII. *Blood.* 88(11):4209–14

BIBLIOGRAPHIE

Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Langley TJ, Church WR, Lollar P. 2007. The humoral response to human factor VIII in hemophilia A mice. *J Thromb Haemost.* 5(3):512–19

Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Langley TJ, Church WR, Lollar P. 2009. The comparative immunogenicity of human and porcine factor VIII in haemophilia A mice. *Thromb Haemost.* 102(7):35–41

Hedner U, Glazer S, Pingel K, Alberts KA, Blombäck M, et al. 1988. Successful use of recombinant factor VIIa in patient with severe haemophilia A during synovectomy. *Lancet.* 2(8621):1193

Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. 2002. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost.* 88(2):186–93

Hellman L, Smedsröd B, Sandberg H, Pettersson U. 1989. Secretion of coagulant factor VIII activity and antigen by in vitro cultivated rat liver sinusoidal endothelial cells. *Br J Haematol.* 73(3):348–55

Hemberger M, Hanna CW, Dean W. 2020. Mechanisms of early placental development in mouse and humans. *Nat Rev Genet.* 21(1):27–43

Hepner M, Karlaftis V. 2013. Antithrombin. In *Haemostasis: Methods and Protocols*, ed. P Monagle, pp. 355–64. Totowa, NJ: Humana Press

Herczenik E, van Haren SD, Wroblewska A, Kaijen P, van den Biggelaar M, et al. 2012. Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J Allergy Clin Immunol.* 129(2):501–9, 509.e1-5

Hermeling S, Crommelin DJA, Schellekens H, Jiskoot W. 2004. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharm Res.* 21(6):897–903

Hertig AT, Rock J, Adams EC. 1956. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat.* 98(3):435–93

Herz J, Clouthier DE, Hammer RE. 1992. LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell.* 71(3):411–21

Hilgartner M, Aledort L, Andes A, Gill J, Group the members of the FS. 1990. Efficacy and safety of vapor-heated anti-inhibitor coagulant complex in hemophilia patients. FEIBA Study Group. *Transfusion.* 30(7):626–30

Hironaka T, Furukawa K, Esmon PC, Fournel MA, Sawada S, et al. 1992. Comparative study of the sugar chains of factor VIII purified from human plasma and from the culture media of recombinant baby hamster kidney cells. *J Biol Chem.* 267(12):8012–20

BIBLIOGRAPHIE

- Hironiwa N, Ishii S, Kadono S, Iwayanagi Y, Mimoto F, et al. 2016. Calcium-dependent antigen binding as a novel modality for antibody recycling by endosomal antigen dissociation. *MAbs*. 8(1):65–73
- Hodge G, Flower R, Han P. 1999. Effect of factor VIII concentrate on leucocyte cytokine production: characterization of TGF-beta as an immunomodulatory component in plasma-derived factor VIII concentrate. *Br J Haematol*. 106(3):784–91
- Hofbauer CJ, Kepa S, Schemper M, Quehenberger P, Reitter-Pfoertner S, et al. 2016. FVIII-binding IgG modulates FVIII half-life in patients with severe and moderate hemophilia A without inhibitors. *Blood*. 128(2):293–96
- Hofbauer CJ, Whelan SFJ, Hirschler M, Allacher P, Horling FM, et al. 2015. Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and nonneutralizing antibodies in humans. *Blood*. 125(7):1180–88
- Hoff JM, Daltveit AK, Gilhus NE. 2006. Artrogryposis multiplex congenita -- a rare fetal condition caused by maternal myasthenia gravis. *Acta Neurol Scand Suppl*. 183:26–27
- Hoffman M, Monroe DM. 2001. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 85(6):958–65
- Hoffman M, Monroe DM, Oliver JA, Roberts HR. 1995. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood*. 86(5):1794–1801
- Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD. 1999. The role of allergy in the development of asthma. *Nature*. 402(6760 Suppl):B12-17
- Home P, Kurtzhals P. 2006. Insulin detemir: from concept to clinical experience. *Expert Opin Pharmacother*. 7(3):325–43
- Hopff F. 1828. *Ueber Die Haemophilie, Oder Die Erbliche Anlage Zu Tödlichen Blutungen: Inaugural-Abhandlung*. Würzburg: Becker
- Horii M, Boyd TK, Parast MM. 2018. Chapter 29 - Placental Development and Complications of Prevalable Pregnancy. In *Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology (Third Edition)*, eds. CP Crum, MR Nucci, BE Howitt, SR Granter, MM Parast, TK Boyd, pp. 1070–1102. Philadelphia: Elsevier
- Hu C, Lipshutz GS. 2012. AAV-based neonatal gene therapy for hemophilia A: long-term correction and avoidance of immune responses in mice. *Gene Ther*. 19(12):1166–76
- Hu G, Guo D, Key NS, Conti-Fine BM. 2007. Cytokine production by CD4+ T cells specific for coagulation factor VIII in healthy subjects and haemophilia A patients. *Thromb Haemost*. 97(5):788–94

BIBLIOGRAPHIE

Hu G-L, Okita DK, Conti-Fine BM. 2004. T cell recognition of the A2 domain of coagulation factor VIII in hemophilia patients and healthy subjects. *J Thromb Haemost.* 2(11):1908–17

Hu G-L, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Conti-Fine BM. 2003. Recognition of coagulation factor VIII by CD4+ T cells of healthy humans. *J Thromb Haemost.* 1(10):2159–66

Huang DR, Pirskanen R, Matell G, Lefvert AK. 1999. Tumour necrosis factor-alpha polymorphism and secretion in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 94(1–2):165–71

Huang J-P, Hsieh PCH, Chen C-Y, Wang T-Y, Chen P-C, et al. 2015. Nanoparticles can cross mouse placenta and induce trophoblast apoptosis. *Placenta.* 36(12):1433–41

Huber AH, Kelley RF, Gastinel LN, Bjorkman PJ. 1993. Crystallization and stoichiometry of binding of a complex between a rat intestinal Fc receptor and Fc. *J. Mol. Biol.* 230(3):1077–83

Huel C, Guibourdenche J, Vuillard E, Ouahba J, Piketty M, et al. 2009. Use of ultrasound to distinguish between fetal hyperthyroidism and hypothyroidism on discovery of a goiter. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.* 33(4):412–20

Hurlbut GD, Ziegler RJ, Nietupski JB, Foley JW, Woodworth LA, et al. 2010. Preexisting immunity and low expression in primates highlight translational challenges for liver-directed AAV8-mediated gene therapy. *Mol Ther.* 18(11):1983–94

Hynes HE, Owen CA, Bowie EJ, Thompson JH. 1969. Development of the present concept of hemophilia. *Mayo Clin Proc.* 44(3):193–206

Igawa T, Ishii S, Tachibana T, Maeda A, Higuchi Y, et al. 2010. Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat Biotechnol.* 28(11):1203–7

Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Niggemann B, et al. 2001. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108(5):709–14

Ingerslev J, Freidman D, Gastineau D, Gilchrist G, Johnsson H, et al. 1996. Major surgery in haemophilic patients with inhibitors using recombinant factor VIIa. *Haemostasis.* 26 Suppl 1:118–23

Ingram GI. 1976. The history of haemophilia. *J Clin Pathol.* 29(6):469–79

Israel EJ, Patel VK, Taylor SF, Marshak-Rothstein A, Simister NE. 1995. Requirement for a beta 2-microglobulin-associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice. *J. Immunol.* 154(12):6246–51

Israel EJ, Taylor S, Wu Z, Mizoguchi E, Blumberg RS, et al. 1997. Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology.* 92(1):69–74

BIBLIOGRAPHIE

- Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, Schoenfeld D, Simister NE. 1996. Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology*. 89(4):573–78
- Jacquemin M, Benhida A, Peerlinck K, Desqueper B, Vander Elst L, et al. 2000a. A human antibody directed to the factor VIII C1 domain inhibits factor VIII cofactor activity and binding to von Willebrand factor. *Blood*. 95(1):156–63
- Jacquemin M, De Maeyer M, D’Oiron R, Lavend’Homme R, Peerlinck K, Saint-Remy J-M. 2003a. Molecular mechanisms of mild and moderate hemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 1(3):456–63
- Jacquemin M, Gilles JG, Saint-Remy J-M. 2010. Antibodies binding to the A2 domain of FVIII and inhibiting coagulation activity. *US7858089B2*
- Jacquemin M, Lavend’homme R, Benhida A, Vanzielegem B, d’Oiron R, et al. 2000b. A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood*. 96(3):958–65
- Jacquemin M, Neyrinck A, Hermanns MI, Lavend’homme R, Rega F, et al. 2006. FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood*. 108(2):515–17
- Jacquemin M, Vantomme V, Buhot C, Lavend’homme R, Burny W, et al. 2003b. CD4+ T-cell clones specific for wild-type factor VIII: a molecular mechanism responsible for a higher incidence of inhibitor formation in mild/moderate hemophilia A. *Blood*. 101(4):1351–58
- Jacquemin MG, Desqueper BG, Benhida A, Vander Elst L, Hoylaerts MF, et al. 1998. Mechanism and kinetics of factor VIII inactivation: study with an IgG4 monoclonal antibody derived from a hemophilia A patient with inhibitor. *Blood*. 92(2):496–506
- James EA, Kwok WW, Ettinger RA, Thompson AR, Pratt KP. 2007. T-cell responses over time in a mild hemophilia A inhibitor subject: epitope identification and transient immunogenicity of the corresponding self-peptide. *J Thromb Haemost*. 5(12):2399–2407
- James JL, Carter AM, Chamley LW. 2012. Human placentation from nidation to 5 weeks of gestation. Part I: What do we know about formative placental development following implantation? *Placenta*. 33(5):327–34
- Jankowska KI, McGill J, Pezeshkpoor B, Oldenburg J, Atreya CD, Sauna ZE. 2020. Clinical manifestation of hemophilia A in the absence of mutations in the F8 gene that encodes FVIII: role of microRNAs. *Transfusion*. 60(2):401–13
- Jankowski W, Park Y, McGill J, Maraskovsky E, Hofmann M, et al. 2019. Peptides identified on monocyte-derived dendritic cells: a marker for clinical immunogenicity to FVIII products. *Blood Adv*. 3(9):1429–40

BIBLIOGRAPHIE

- Jansen BC, Bondt A, Reiding KR, Scherjon SA, Vidarsson G, Wuhrer M. 2016. MALDI-TOF-MS reveals differential N-linked plasma- and IgG-glycosylation profiles between mothers and their newborns. *Sci Rep.* 6:34001
- Jenne CN, Kubes P. 2013. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol.* 14(10):996–1006
- Jennewein MF, Goldfarb I, Dolatshahi S, Cosgrove C, Noelette FJ, et al. 2019. Fc Glycan-Mediated Regulation of Placental Antibody Transfer. *Cell.* 178(1):202-215.e14
- Jiang H, Couto LB, Patarroyo-White S, Liu T, Nagy D, et al. 2006. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood.* 108(10):3321–28
- Jiménez-Yuste V, Auerswald G, Benson G, Lambert T, Morfini M, et al. 2014. Achieving and maintaining an optimal trough level for prophylaxis in haemophilia: the past, the present and the future. *Blood Transfus.* 12(3):314–19
- Jiménez-Yuste V, Rodríguez-Merchán EC, Matsushita T, Holme PA. 2021. Concomitant use of bypassing agents with emicizumab for people with haemophilia A and inhibitors undergoing surgery. *Haemophilia.* 27(4):519–30
- Jin F, Balthasar JP. 2005. Mechanisms of intravenous immunoglobulin action in immune thrombocytopenic purpura. *Hum. Immunol.* 66(4):403–10
- Jing W, Chen J, Cai Y, Chen Y, Schroeder JA, et al. 2019. Induction of activated T follicular helper cells is critical for anti-FVIII inhibitor development in hemophilia A mice. *Blood Adv.* 3(20):3099–3110
- Johansson AG, LØVDAL T, Magnusson K-E, Berg T, Skogh T. 1996. Liver Cell Uptake and Degradation of Soluble Immunoglobulin G Immune Complexes In Vivo and In Vitro in Rats. . 24(1):7
- Johnsen JM, Fletcher SN, Huston H, Roberge S, Martin BK, et al. 2017. Novel approach to genetic analysis and results in 3000 hemophilia patients enrolled in the My Life, Our Future initiative. *Blood Adv.* 1(13):824–34
- Jones EA, Waldmann TA. 1972. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J. Clin. Invest.* 51(11):2916–27
- Jones TD, Phillips WJ, Smith BJ, Bamford CA, Nayee PD, et al. 2005. Identification and removal of a promiscuous CD4+ T cell epitope from the C1 domain of factor VIII. *J Thromb Haemost.* 3(5):991–1000
- Jun Z, Ming-ming L, Qian-qing Z, Yun-hong W, Chong-yang Z, Xin L. 2020. Functional identification of factor VIII B domain regions in hepatocyte cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 526(3):633–40

BIBLIOGRAPHIE

- Jung SM, Moroi M. 2000. Activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1): its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. *Trends Cardiovasc Med.* 10(7):285–92
- Junghans RP, Anderson CL. 1996. The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93(11):5512–16
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Foeller C, Gottesman KS. 1992. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. DIANE Publishing
- Kamaté C, Lenting PJ, van den Berg HM, Mutis T. 2007. Depletion of CD4+/CD25high regulatory T cells may enhance or uncover factor VIII-specific T-cell responses in healthy individuals. *J Thromb Haemost.* 5(3):611–13
- Kandil E, Egashira M, Miyoshi O, Niikawa N, Ishibashi T, et al. 1996. The human gene encoding the heavy chain of the major histocompatibility complex class I-like Fc receptor (FCGRT) maps to 19q13.3. *Cytogenet. Cell Genet.* 73(1–2):97–98
- Kannicht C, Ramström M, Kohla G, Tiemeyer M, Casademunt E, et al. 2013. Characterisation of the post-translational modifications of a novel, human cell line-derived recombinant human factor VIII. *Thromb Res.* 131(1):78–88
- Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, Iwamoto M, Madoiwa S, et al. 2012. Porcine model of hemophilia A. *PLoS One.* 7(11):e49450
- Kasper CK, Aledort L, Aronson D, Counts R, Edson JR, et al. 1975. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh.* 34(2):612
- Kaufman RJ, Wasley LC, Davies MV, Wise RJ, Israel DI, Dorner AJ. 1989. Effect of von Willebrand factor coexpression on the synthesis and secretion of factor VIII in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol.* 9(3):1233–42
- Kavakli K, Makris M, Zulfikar B, Erhardtson E, Abrams ZS, et al. 2006. Home treatment of haemarthroses using a single dose regimen of recombinant activated factor VII in patients with haemophilia and inhibitors. A multi-centre, randomised, double-blind, cross-over trial. *Thromb Haemost.* 95(4):600–605
- Kelly DA, Summerfield JA, Tuddenham EG. 1984. Localization of factor VIIIc: antigen in guinea-pig tissues and isolated liver cell fractions. *Br J Haematol.* 56(4):535–43
- Key NS, Aledort LM, Beardsley D, Cooper HA, Davignon G, et al. 1998. Home treatment of mild to moderate bleeding episodes using recombinant factor VIIa (Novoseven) in haemophiliacs with inhibitors. *Thromb Haemost.* 80(6):912–18
- Kim JK, Firan M, Radu CG, Kim CH, Ghetie V, Ward ES. 1999. Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn. *Eur. J. Immunol.* 29(9):2819–25

BIBLIOGRAPHIE

- Kim JK, Tsen MF, Ghetie V, Ward ES. 1994a. Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Immunol.* 24(3):542–48
- Kim JK, Tsen MF, Ghetie V, Ward ES. 1994b. Localization of the site of the murine IgG1 molecule that is involved in binding to the murine intestinal Fc receptor. *Eur. J. Immunol.* 24(10):2429–34
- Kim JK, Tsen MF, Ghetie V, Ward ES. 1994c. Catabolism of the murine IgG1 molecule: evidence that both CH2-CH3 domain interfaces are required for persistence of IgG1 in the circulation of mice. *Scand. J. Immunol.* 40(4):457–65
- Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, et al. 2012. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med.* 18(10):1570–74
- Kizilocak H, Marquez-Casas E, Phei Wee C, Malvar J, Carmona R, Young G. 2021. Comparison of bypassing agents in patients on emicizumab using global hemostasis assays. *Haemophilia.* 27(1):164–72
- Kjalke M, Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Ezban M, Roberts HR. 1998. Active site-inactivated factors VIIa, Xa, and IXa inhibit individual steps in a cell-based model of tissue factor-initiated coagulation. *Thromb Haemost.* 80(4):578–84
- Klamroth R, Hayes G, Andreeva T, Gregg K, Suzuki T, et al. 2022. Global Seroprevalence of Pre-existing Immunity Against AAV5 and Other AAV Serotypes in People with Hemophilia A. *Hum Gene Ther.* 33(7–8):432–41
- Klein U, Rajewsky K, Küppers R. 1998. Human Immunoglobulin (Ig)M+IgD+ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. *Journal of Experimental Medicine.* 188(9):1679–89
- Klopp N, Oldenburg J, Uen C, Schneppenheim R, Graw J. 2002. 11 hemophilia A patients without mutations in the factor VIII encoding gene. *Thromb Haemost.* 88(2):357–60
- Knight C, Paisley S, Wight J, Jones ML. 2003. Economic modelling of different treatment strategies for haemophilia A with high-responding inhibitors. *Haemophilia.* 9(4):521–40
- Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. 2019. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cell Mol Life Sci.* 76(18):3479–96
- Knolle PA, Wohlleber D. 2016. Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells. *Cell Mol Immunol.* 13(3):347–53

BIBLIOGRAPHIE

Knudsen T, Johansen P, Reckless J, Desai S, Blouse GE. 2021. Subcutaneous Marzeptacog Alfa (Activated) Versus Intravenous rFVIIa for Treatment of Episodic Bleeding in FVIII Deficient Hemophilia A Rats. *Blood*. 138:3181

Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y. 2002. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 282(2):F358-365

Kohler PF, Farr RS. 1966. Elevation of cord over maternal IgG immunoglobulin: evidence for an active placental IgG transport. *Nature*. 210(5040):1070–71

Königs C, Ozelo MC, Dunn A, Kulkarni R, Nolan B, et al. 2022. First study of extended half-life rFVIII-Fc in previously untreated patients with hemophilia A: PUPs A-LONG final results. *Blood*. 139(26):3699–3707

Konkle BA, Ebbesen LS, Erhardtsen E, Bianco RP, Lissitchkov T, et al. 2007. Randomized, prospective clinical trial of recombinant factor VIIa for secondary prophylaxis in hemophilia patients with inhibitors. *J Thromb Haemost*. 5(9):1904–13

Konkle BA, Shapiro AD, Quon DV, Staber JM, Kulkarni R, et al. 2020. BIVV001 Fusion Protein as Factor VIII Replacement Therapy for Hemophilia A. *N Engl J Med*. 383(11):1018–27

Kootstra NA, Matsumura R, Verma IM. 2003. Efficient production of human FVIII in hemophilic mice using lentiviral vectors. *Molecular Therapy*. 7(5):623–31

Kosloski MP, Miclea RD, Balu-Iyer SV. 2009. Role of glycosylation in conformational stability, activity, macromolecular interaction and immunogenicity of recombinant human factor VIII. *AAPS J*. 11(3):424–31

Kosugi I, Muro H, Shirasawa H, Ito I. 1992. Endocytosis of soluble IgG immune complex and its transport to lysosomes in hepatic sinusoidal endothelial cells. *Journal of Hepatology*. 16(1):106–14

Krishnamoorthy S, Liu T, Drager D, Patarroyo-White S, Chhabra ES, et al. 2016. Recombinant factor VIII Fc (rFVIII-Fc) fusion protein reduces immunogenicity and induces tolerance in hemophilia A mice. *Cell Immunol*. 301:30–39

Kristoffersen EK, Ulvestad E, Vedeler CA, Matre R. 1990. Fcγ Receptor Heterogeneity in the Human Placenta. *Scandinavian Journal of Immunology*. 32(5):561–64

Kubota Y, Sato H, Koshimoto C, Takahashi S. 1993. Transfer of ²³⁹Pu to mouse fetoplacental tissues. *Journal of Radiation Research*. 34(2):157–63

Kuether EL, Schroeder JA, Fahs SA, Cooley BC, Chen Y, et al. 2012. Lentivirus-mediated platelet gene therapy of murine hemophilia A with pre-existing anti-factor VIII immunity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 10(8):1570–80

BIBLIOGRAPHIE

Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton RE. 2001. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther.* 12(15):1893–1905

Kwak H, Lee S, Jo S, Kwon YE, Kang H, et al. 2020. MG1113, a specific anti-tissue factor pathway inhibitor antibody, rebalances the coagulation system and promotes hemostasis in hemophilia. *Res Pract Thromb Haemost.* 4(8):1301–12

Kwon K-C, Sherman A, Chang W-J, Kamesh A, Biswas M, et al. 2018. Expression and assembly of largest foreign protein in chloroplasts: oral delivery of human FVIII made in lettuce chloroplasts robustly suppresses inhibitor formation in haemophilia A mice. *Plant Biotechnol J.* 16(6):1148–60

Lacroix-Desmazes S, Bayry J, Misra N, Horn MP, Villard S, et al. 2002. The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII in hemophilia A. *N Engl J Med.* 346(9):662–67

Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. 2003. Catalytic antibodies to factor VIII in haemophilia A. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 14 Suppl 1:S31-34

Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Pashov A, Sooryanarayana null, Stahl D, et al. 2000. Natural antibodies to factor VIII. *Semin Thromb Hemost.* 26(2):157–65

Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana null, Bonnemain C, Stieltjes N, et al. 1999. Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat Med.* 5(9):1044–47

Lacroix-Desmazes S, Navarrete A-M, André S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. 2008. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood.* 112(2):240–49

Lai J, Hough C, Tarrant J, Lillicrap D. 2017. Biological considerations of plasma-derived and recombinant factor VIII immunogenicity. *Blood.* 129(24):3147–54

Lai JD, Cartier D, Hartholt RB, Swystun LL, van Velzen AS, et al. 2018a. Early cellular interactions and immune transcriptome profiles in human factor VIII-exposed hemophilia A mice. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 16(3):533–45

Lai JD, Lillicrap D. 2017. Factor VIII inhibitors: Advances in basic and translational science. *International Journal of Laboratory Hematology.* 39(S1):6–13

Lai JD, Moorehead PC, Sponagle K, Steinitz KN, Reipert BM, et al. 2016. Concurrent influenza vaccination reduces anti-FVIII antibody responses in murine hemophilia A. *Blood.* 127(26):3439–49

Lai JD, Swystun LL, Cartier D, Nesbitt K, Zhang C, et al. 2018b. N-linked glycosylation modulates the immunogenicity of recombinant human factor VIII in hemophilia A mice. *Haematologica.* 103(11):1925–36

BIBLIOGRAPHIE

- Lambrecht BN. 2018. FcRn is mother's milk to allergen tolerance. *J. Exp. Med.* 215(1):1–3
- Lane S. 1840. HÆMORRHAGIC DIATHESIS.: SUCCESSFUL TRANSFUSION OF BLOOD. *The Lancet.* 35(896):185–88
- Lange AM, Altynova ES, Nguyen GN, Sabatino DE. 2016. Overexpression of factor VIII after AAV delivery is transiently associated with cellular stress in hemophilia A mice. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 3:16064
- Lapalud P, Rothschild C, Mathieu-Dupas E, Balicchi J, Gruel Y, et al. 2015. Anti-A2 and anti-A1 domain antibodies are potential predictors of immune tolerance induction outcome in children with hemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 13(4):540–47
- Lapan KA, Fay PJ. 1997. Localization of a Factor X Interactive Site in the A1 Subunit of Factor VIIIa *. *Journal of Biological Chemistry.* 272(4):2082–88
- Lapan KA, Fay PJ. 1998. Interaction of the A1 subunit of factor VIIIa and the serine protease domain of factor X identified by zero-length cross-linking. *Thromb Haemost.* 80(3):418–22
- Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, et al. 2005. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant.* 5(3):443–53
- Lasne D, Jude B, Susen S. 2006. From normal to pathological hemostasis. *Can J Anaesth.* 53(6 Suppl):S2-11
- Latvala S, Jacobsen B, Otteneder MB, Herrmann A, Kronenberg S. 2017. Distribution of FcRn Across Species and Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 65(6):321–33
- Lauritzen B, Olling J, Abel KL, Augustsson C, Balling K, et al. 2019. Administration of recombinant FVIIa (rFVIIa) to concizumab-dosed monkeys is safe, and concizumab does not affect the potency of rFVIIa in hemophilic rabbits. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 17(3):460–69
- Leach JL, Sedmak DD, Osborne JM, Rahill B, Lairmore MD, Anderson CL. 1996. Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J. Immunol.* 157(8):3317–22
- Lee CA, Lillicrap D, Astermark J. 2006. Inhibitor Development in Hemophiliacs: The Roles of Genetic versus Environmental Factors. *Semin Thromb Hemost.* 32(S 2):10–14
- Lee DSW, Rojas OL, Gommerman JL. 2021. B cell depletion therapies in autoimmune disease: advances and mechanistic insights. *Nat Rev Drug Discov.* 20(3):179–99
- Leebeek FWG, Duvekot J, Kruij MJHA. 2020. How I manage pregnancy in carriers of hemophilia and patients with von Willebrand disease. *Blood.* 136(19):2143–50

BIBLIOGRAPHIE

Leissing C, Cooper DL, Solem CT, HTRS Investigators. 2011. Assessing the impact of age, race, ethnicity and inhibitor status on functional limitations of patients with severe and moderately severe haemophilia A. *Haemophilia*. 17(6):884–89

Leksa NC, Chiu P-L, Bou-Assaf GM, Quan C, Liu Z, et al. 2017. The structural basis for the functional comparability of factor VIII and the long-acting variant recombinant factor VIII Fc fusion protein. *J Thromb Haemost*. 15(6):1167–79

Lenk H. 1999. The German National Immune Tolerance Registry, 1997 Update. *VOX*. 77(Suppl. 1):28–30

Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BM, Clijsters PP, Meijerman DW, et al. 1999. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem*. 274(34):23734–39

Lenting PJ, van de Loo JW, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K. 1996. The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem*. 271(4):1935–40

Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. 1998. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 92(11):3983–96

Lenting PJ, VAN Schooten CJM, Denis CV. 2007. Clearance mechanisms of von Willebrand factor and factor VIII. *J Thromb Haemost*. 5(7):1353–60

Les données de deux études de phase III montrant que le fitusiran réduit significativement les saignements chez les personnes atteintes d'hémophilie A ou B, avec ou sans inhibiteurs, ont été présentées au Congrès de l'ASH - Sanofi. www.sanofi.com

Lewis DA, Bovenschen N, Mertens K, Voorberg J, Ortel TL. 2005. Phospholipid vesicles interfere with the binding of antibody fragments to the light chain of factor VIII. *Thromb Haemost*. 93(5):833–41

Lewis-Jones DI, Lewis-Jones MS, Connolly RC, Lloyd DC, West CR. 1985. Sequential changes in the antimicrobial protein concentrations in human milk during lactation and its relevance to banked human milk. *Pediatr. Res*. 19(6):561–65

Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, Huttner WB, Verbeet MP, et al. 1991. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 266(2):740–46

Leyte A, Verbeet MP, Brodniewicz-Proba T, Van Mourik JA, Mertens K. 1989. The interaction between human blood-coagulation factor VIII and von Willebrand factor. Characterization of a high-affinity binding site on factor VIII. *Biochem J*. 257(3):679–83

Li T, Balthasar JP. 2018. FcRn Expression in Wildtype Mice, Transgenic Mice, and in Human Tissues. *Biomolecules*. 8(4):

BIBLIOGRAPHIE

- Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. 2005. Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*. 175(7):4180–83
- Ling LE, Hillson JL, Tiessen RG, Bosje T, van Iersel MP, et al. 2019. M281, an Anti-FcRn Antibody: Pharmacodynamics, Pharmacokinetics, and Safety Across the Full Range of IgG Reduction in a First-in-Human Study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 105(4):1031–39
- Liu CL, Ye P, Lin J, Djukovic D, Miao CH. 2014. Long-term tolerance to factor VIII is achieved by administration of interleukin-2/interleukin-2 monoclonal antibody complexes and low dosages of factor VIII. *J Thromb Haemost.* 12(6):921–31
- Liu L, Liu H, Mah C, Fletcher BS. 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase attenuates inhibitor development in gene-therapy-treated hemophilia A mice. *Gene Ther.* 16(6):724–33
- Liu ML, Shen BW, Nakaya S, Pratt KP, Fujikawa K, et al. 2000. Hemophilic factor VIII C1- and C2-domain missense mutations and their modeling to the 1.5-angstrom human C2-domain crystal structure. *Blood*. 96(3):979–87
- Liu Z, Zheng C, Sabatino DE, Zhang B. 2016. The C Domain Mediates the Export of FVIII from the Endoplasmic Reticulum By Interacting with MCFD2. *Blood*. 128(22):255
- Llanos C, Friedman DM, Saxena A, Izmirly PM, Tseng C-E, et al. 2012. Anatomical and pathological findings in hearts from fetuses and infants with cardiac manifestations of neonatal lupus. *Rheumatology (Oxford)*. 51(6):1086–92
- Lollar P, Parker ET, Curtis JE, Helgerson SL, Hoyer LW, et al. 1994. Inhibition of human factor VIIIa by anti-A2 subunit antibodies. *J Clin Invest.* 93(6):2497–2504
- Lollar P, Parker ET, Fay PJ. 1992. Coagulant properties of hybrid human/porcine factor VIII molecules. *Journal of Biological Chemistry*. 267(33):23652–57
- Longsworth LG, Curtis RM, Pembroke RH. 1945. The electrophoretic analysis of maternal and fetal plasmas and sera. *J. Clin. Invest.* 24(1):46–53
- Lorenzo JJ, López A, Altisent C, Aznar JA. 2001. Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age. *Br J Haematol.* 113(3):600–603
- Lövgren KM, Søndergaard H, Skov S, Weldingh KN, Tranholm M, Wiinberg B. 2016. Antibody response to recombinant human coagulation factor VIII in a new rat model of severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 14(4):747–56
- Lozach P-Y, Burleigh L, Staropoli I, Amara A. 2007. The C Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN. In *Glycovirology Protocols*, ed. RJ Sugrue, pp. 51–68. Totowa, NJ: Humana Press
- Lozier JN, Dutra A, Pak E, Zhou N, Zheng Z, et al. 2002. The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(20):12991–96

BIBLIOGRAPHIE

- Lozier JN, Rosenberg PS, Goedert JJ, Menashe I. 2011. A case-control study reveals immunoregulatory gene haplotypes that influence inhibitor risk in severe haemophilia A. *Haemophilia*. 17(4):641–49
- Lü J, Pipe SW, Miao H, Jacquemin M, Gilbert GE. 2011. A membrane-interactive surface on the factor VIII C1 domain cooperates with the C2 domain for cofactor function. *Blood*. 117(11):3181–89
- Lu L, Qian XF, Rao JH, Wang XH, Zheng SG, Zhang F. 2010. Rapamycin promotes the expansion of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells after liver transplantation. *Transplant Proc*. 42(5):1755–57
- Lundquist L. 2007. Abatacept: a novel therapy approved for the treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Adv Ther*. 24(2):333–45
- Lunney JK. 2007. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci*. 3(3):179–84
- Lytle AM, Brown HC, Paik NY, Knight KA, Wright JF, et al. 2016. Effects of FVIII immunity on hepatocyte and hematopoietic stem cell-directed gene therapy of murine hemophilia A. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 3:15056
- Machin N, Ragni MV. 2018. An investigational RNAi therapeutic targeting antithrombin for the treatment of hemophilia A and B. *J Blood Med*. 9:135–40
- Mackness BC, Jaworski JA, Boudanova E, Park A, Valente D, et al. 2019. Antibody Fc engineering for enhanced neonatal Fc receptor binding and prolonged circulation half-life. *MAbs*. 11(7):1276–88
- Maclean PS, Richards M, Williams M, Collins P, Liesner R, et al. 2011. Treatment related factors and inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia*. 17(2):282–87
- Madeira CL, Layman ME, de Vera RE, Fontes PA, Ragni MV. 2009. Extrahepatic factor VIII production in transplant recipient of hemophilia donor liver. *Blood*. 113(21):5364–65
- Mahlangu J, Kuliczowski K, Karim FA, Stasyshyn O, Kosinova MV, et al. 2016. Efficacy and safety of rVIII-SingleChain: results of a phase 1/3 multicenter clinical trial in severe hemophilia A. *Blood*. 128(5):630–37
- Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, Chowdary P, Josephson NC, et al. 2014. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood*. 123(3):317–25
- Mahlangu JN. 2021. Progress in the Development of Anti-tissue Factor Pathway Inhibitors for Haemophilia Management. *Frontiers in Medicine*. 8:
- Maldonado RA, LaMothe RA, Ferrari JD, Zhang A-H, Rossi RJ, et al. 2015. Polymeric synthetic nanoparticles for the induction of antigen-specific immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(2):E156-165

BIBLIOGRAPHIE

Malec LM, Journeycake J, Ragni MV. 2016. Extended half-life factor VIII for immune tolerance induction in haemophilia. *Haemophilia*. 22(6):e552–54

Malek A. 2003. Ex vivo human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses. *Vaccine*. 21(24):3362–64

Malek A, Sager R, Kuhn P, Nicolaides KH, Schneider H. 1996. Evolution of maternofetal transport of immunoglobulins during human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 36(5):248–55

Malek A, Sager R, Schneider H. 1994. Maternal-fetal transport of immunoglobulin G and its subclasses during the third trimester of human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 32(1):8–14

Malisan F, Brière F, Bridon JM, Harindranath N, Mills FC, et al. 1996. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med.* 183(3):937–47

Mancuso ME, Male C, Kenet G, Kavakli K, Königs C, et al. 2021. Prophylaxis in children with haemophilia in an evolving treatment landscape. *Haemophilia*. 27(6):889–96

Mancuso ME, Santagostino E. 2017. Outcome of Clinical Trials with New Extended Half-Life FVIII/IX Concentrates. *J Clin Med.* 6(4):E39

Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, et al. 2006. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 12(3):342–47

Mannucci PM, Franchini M. 2017. Porcine recombinant factor VIII: an additional weapon to handle anti-factor VIII antibodies. *Blood Transfus.* 15(4):365–68

Mannucci PM, Tuddenham EG. 2001. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med.* 344(23):1773–79

Marchioro TL, Hougie C, Ragde H, Epstein RB, Thomas ED. 1969. Hemophilia: Role of Organ Homografts. *Science.* 163(3863):188–90

Margaritis P, Roy E, Aljamali MN, Downey HD, Giger U, et al. 2009. Successful treatment of canine hemophilia by continuous expression of canine FVIIa. *Blood.* 113(16):3682–89

Mariani G, Kroner B, Immune Tolerance Study Group (ITSG). 2001. Immune tolerance in hemophilia with factor VIII inhibitors: predictors of success. *Haematologica.* 86(11):1186–93

Marinello WP, Patisaul HB. 2021. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) and placental function: Impact on fetal brain development. *Adv Pharmacol.* 92:347–400

BIBLIOGRAPHIE

- Marquette KA, Pittman DD, Kaufman RJ. 1995. A 110-amino acid region within the A1-domain of coagulation factor VIII inhibits secretion from mammalian cells. *J Biol Chem.* 270(17):10297–303
- Martin WL, Bjorkman PJ. 1999. Characterization of the 2:1 complex between the class I MHC-related Fc receptor and its Fc ligand in solution. *Biochemistry.* 38(39):12639–47
- Martin WL, West AP, Gan L, Bjorkman PJ. 2001. Crystal Structure at 2.8 Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. *Molecular Cell.* 7(4):867–77
- Martinez DR, Fong Y, Li SH, Yang F, Jennewein MF, et al. 2019. Fc Characteristics Mediate Selective Placental Transfer of IgG in HIV-Infected Women. *Cell.* 178(1):190-201.e11
- Martinez DR, Fouda GG, Peng X, Ackerman ME, Permar SR. 2018. Noncanonical placental Fc receptors: What is their role in modulating transplacental transfer of maternal IgG? *PLOS Pathogens.* 14(8):e1007161
- Martinez-Pomares L, Linehan SA, Taylor PR, Gordon S. 2001. Binding properties of the mannose receptor. *Immunobiology.* 204(5):527–35
- Massicotte P, Mitchell L, Andrew M. 1986. A Comparative Study of Coagulation Systems in Newborn Animals. *Pediatr Res.* 20(10):961–65
- Mathiesen L, Nielsen LK, Andersen JT, Grevys A, Sandlie I, et al. 2013. Maternofetal transplacental transport of recombinant IgG antibodies lacking effector functions. *Blood.* 122(7):1174–81
- Matino D, Gargaro M, Santagostino E, Di Minno MND, Castaman G, et al. 2015. IDO1 suppresses inhibitor development in hemophilia A treated with factor VIII. *J Clin Invest.* 125(10):3766–81
- Matzinger P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 12:991–1045
- Mausser-Bunschoten EP, Nieuwenhuis HK, Roosendaal G, van den Berg HM. 1995. Low-dose immune tolerance induction in hemophilia A patients with inhibitors. *Blood.* 86(3):983–88
- McCarthy KM, Yoong Y, Simister NE. 2000. Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: a system to study protein transport across epithelia. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 7):1277–85
- McGrogan A, Sneddon S, de Vries CS. 2010. The incidence of myasthenia gravis: a systematic literature review. *Neuroepidemiology.* 34(3):171–83

BIBLIOGRAPHIE

McIntosh J, Lenting PJ, Rosales C, Lee D, Rabbanian S, et al. 2013. Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. *Blood*. 121(17):3335–44

Mckusick VA. 1965. THE ROYAL HEMOPHILIA. *Sci Am*. 213:88–95

Medesan C, Matesoi D, Radu C, Ghetie V, Ward ES. 1997. Delineation of the amino acid residues involved in transcytosis and catabolism of mouse IgG1. *J. Immunol*. 158(5):2211–17

Medesan C, Radu C, Kim JK, Ghetie V, Ward ES. 1996. Localization of the site of the IgG molecule that regulates maternofetal transmission in mice. *Eur. J. Immunol*. 26(10):2533–36

Medzihradzky KF, Besman MJ, Burlingame AL. 1997. Structural characterization of site-specific N-glycosylation of recombinant human factor VIII by reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem*. 69(19):3986–94

Meeks SL, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. 2007. Antihuman factor VIII C2 domain antibodies in hemophilia A mice recognize a functionally complex continuous spectrum of epitopes dominated by inhibitors of factor VIII activation. *Blood*. 110(13):4234–42

Meems H, Meijer AB, Cullinan DB, Mertens K, Gilbert GE. 2009. Factor VIII C1 domain residues Lys 2092 and Phe 2093 contribute to membrane binding and cofactor activity. *Blood*. 114(18):3938–46

Meems H, van den Biggelaar M, Rondaij M, van der Zwaan C, Mertens K, Meijer AB. 2011. C1 domain residues Lys 2092 and Phe 2093 are of major importance for the endocytic uptake of coagulation factor VIII. *Int J Biochem Cell Biol*. 43(8):1114–21

Meller S, Gerber PA, Kislak A, Hevezi P, Göbel T, et al. 2015. Allergic sensitization to pegylated interferon- α results in drug eruptions. *Allergy*. 70(7):775–83

Mellor AL, Munn DH. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 4(10):762–74

Menezes V, Malek A, Keelan JA. 2011. Nanoparticulate drug delivery in pregnancy: placental passage and fetal exposure. *Curr Pharm Biotechnol*. 12(5):731–42

Merlin S, Cannizzo ES, Borroni E, Brusca V, Schinco P, et al. 2017. A Novel Platform for Immune Tolerance Induction in Hemophilia A Mice. *Mol Ther*. 25(8):1815–30

Merlin S, Famà R, Borroni E, Zanolini D, Brusca V, et al. 2019. FVIII expression by its native promoter sustains long-term correction avoiding immune response in hemophilic mice. *Blood Advances*. 3(5):825–38

BIBLIOGRAPHIE

- Meslier Y, André S, Teyssandier M, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. 2010. Maternally transferred anti-factor VIII IgG reduce the anti-factor VIII humoral immune response in factor VIII-deficient mice. *Immunology*. 131(4):549–55
- Metcalfe DD, Peavy RD, Gilfillan AM. 2009. Mechanisms of mast cell signaling in anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124(4):639–46; quiz 647–48
- Metcalfe SM, Fahmy TM. 2012. Targeted nanotherapy for induction of therapeutic immune responses. *Trends in Molecular Medicine*. 18(2):72–80
- Meunier S, Alamelu J, Ehrenforth S, Hanabusa H, Abdul Karim F, et al. 2017a. Safety and efficacy of a glycoPEGylated rFVIII (turoctocog alpha pegol, N8-GP) in paediatric patients with severe haemophilia A. *Thromb Haemost.* 117(9):1705–13
- Meunier S, Menier C, Marcon E, Lacroix-Desmazes S, Maillère B. 2017b. CD4 T cells specific for factor VIII are present at high frequency in healthy donors and comprise naïve and memory cells. *Blood Adv.* 1(21):1842–47
- Miao CH, Harmeling BR, Ziegler SF, Yen BC, Torgerson T, et al. 2009. CD4+FOXP3+ regulatory T cells confer long-term regulation of factor VIII-specific immune responses in plasmid-mediated gene therapy-treated hemophilia mice. *Blood*. 114(19):4034–44
- Miao CH, Ye P, Thompson AR, Rawlings DJ, Ochs HD. 2006. Immunomodulation of transgene responses following naked DNA transfer of human factor VIII into hemophilia A mice. *Blood*. 108(1):19–27
- Miao HZ, Sirachainan N, Palmer L, Kucab P, Cunningham MA, et al. 2004. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood*. 103(9):3412–19
- Michnick DA, Pittman DD, Wise RJ, Kaufman RJ. 1994. Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *Journal of Biological Chemistry*. 269(31):20095–102
- Mikulska JE, Pablo L, Canel J, Simister NE. 2000. Cloning and analysis of the gene encoding the human neonatal Fc receptor. *Eur. J. Immunogenet.* 27(4):231–40
- Miller CH, Benson J, Ellingsen D, Driggers J, Payne A, et al. 2012. F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Haemophilia*. 18(3):375–82
- Milling L, Zhang Y, Irvine DJ. 2017. Delivering safer immunotherapies for cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 114:79–101
- Mimoun A, Delignat S, Peyron I, Daventure V, Lecerf M, et al. 2020. Relevance of the Materno-Fetal Interface for the Induction of Antigen-Specific Immune Tolerance. *Front. Immunol.* 11:

BIBLIOGRAPHIE

- Miranda ME, Tseng CE, Rashbaum W, Ochs RL, Casiano CA, et al. 1998. Accessibility of SSA/Ro and SSB/La antigens to maternal autoantibodies in apoptotic human fetal cardiac myocytes. *J. Immunol.* 161(9):5061–69
- Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. 2004. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol.* 172(8):4676–80
- Mitchell MJ, Jain RK, Langer R. 2017. Engineering and physical sciences in oncology: challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer.* 17(11):659–75
- Moghimi B, Sack BK, Nayak S, Markusic DM, Mah CS, Herzog RW. 2011. Induction of tolerance to factor VIII by transient co-administration with rapamycin. *J Thromb Haemost.* 9(8):1524–33
- Moise KJ. 2008a. Fetal anemia due to non-Rhesus-D red-cell alloimmunization. *Semin Fetal Neonatal Med.* 13(4):207–14
- Moise KJ. 2008b. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 112(1):164–76
- Moise L, Song C, Martin WD, Tassone R, De Groot AS, Scott DW. 2012. Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clin Immunol.* 142(3):320–31
- Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Roberts HR. 1997. Platelet activity of high-dose factor VIIIa is independent of tissue factor. *Br J Haematol.* 99(3):542–47
- Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. 1994. Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *Br J Haematol.* 88(2):364–71
- Montoyo HP, Vaccaro C, Hafner M, Ober RJ, Mueller W, Ward ES. 2009. Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(8):2788–93
- Moreau A, Lacroix-Desmazes S, Stieltjes N, Saenko E, Kaveri SV, et al. 2000. Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity are present in plasma of nonresponder patients with severe hemophilia A and in normal polyclonal human IgG. *Blood.* 95(11):3435–41
- Morel N, Georgin-Lavialle S, Levesque K, Guettrot-Imbert G, Le Guern V, et al. 2015. [Neonatal lupus syndrome: Literature review]. *Rev Med Interne.* 36(3):159–66
- Mosconi E, Rekima A, Seitz-Polski B, Kanda A, Fleury S, et al. 2010. Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. *Mucosal Immunol.* 3(5):461–74
- Mowat AM. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 3(4):331–41

BIBLIOGRAPHIE

- Mueller DL. 2010. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 11(1):21–27
- Mullins ES, Stasyshyn O, Alvarez-Román MT, Osman D, Liesner R, et al. 2017. Extended half-life pegylated, full-length recombinant factor VIII for prophylaxis in children with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 23(2):238–46
- Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, McVey JH, Johnson DJD, et al. 2002. A Tyr346→Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of factor VIII in an individual with factor VIII:C assay discrepancy. *British Journal of Haematology.* 118(2):589–94
- Nardi N, Brito-Zerón P, Ramos-Casals M, Aguiló S, Cervera R, et al. 2006. Circulating auto-antibodies against nuclear and non-nuclear antigens in primary Sjögren's syndrome: prevalence and clinical significance in 335 patients. *Clin. Rheumatol.* 25(3):341–46
- Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, et al. 2011. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med.* 365(25):2357–65
- Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, Caligiuri G, Christophe OD, et al. 2009. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 7(11):1816–23
- Naylor JA, Buck D, Green P, Williamson H, Bentley D, Giannelli F. 1995. Investigation of the factor VIII intron 22 repeated region (int22h) and the associated inversion junctions. *Hum Mol Genet.* 4(7):1217–24
- Negrier C, Goudemand J, Sultan Y, Bertrand M, Rothschild C, Lauroua P. 1997. Multicenter retrospective study on the utilization of FEIBA in France in patients with factor VIII and factor IX inhibitors. French FEIBA Study Group. Factor Eight Bypassing Activity. *Thromb Haemost.* 77(6):1113–19
- Nemazee D. 2017. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol.* 17(5):281–94
- Neuenschwander S, Kissling-Albrecht L, Heiniger J, Backfisch W, Stranzinger G, Pliska V. 1992. Inherited defect of blood clotting factor VIII (haemophilia A) in sheep. *Thromb Haemost.* 68(5):618–20
- Neuenschwander S, Pliska V. 1994. Factor VIII in blood plasma of haemophilic sheep: analysis of clotting time-plasma dilution curves. *Haemostasis.* 24(1):27–35
- Nguyen P-CT, Lewis KB, Ettinger RA, Schuman JT, Lin JC, et al. 2014. High-resolution mapping of epitopes on the C2 domain of factor VIII by analysis of point mutants using surface plasmon resonance. *Blood.* 123(17):2732–39

BIBLIOGRAPHIE

- Nic Lochlainn LM, de Gier B, van der Maas N, van Binnendijk R, Strebel PM, et al. 2019. Effect of measles vaccination in infants younger than 9 months on the immune response to subsequent measles vaccine doses: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 19(11):1246–54
- Nichols WC, Seligsohn U, Zivelin A, Terry VH, Hertel CE, et al. 1998. Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell.* 93(1):61–70
- Nicoara C, Zäch K, Trachsel D, Germann D, Matter L. 1999. Decay of passively acquired maternal antibodies against measles, mumps, and rubella viruses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6(6):868–71
- Nielsen LN, Wiinberg B, Häger M, Holmberg HL, Hansen JJ, et al. 2014. A novel F8 $-/-$ rat as a translational model of human hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 12(8):1274–82
- Nogami K, Shima M, Hosokawa K, Nagata M, Koide T, et al. 2000. Factor VIII C2 domain contains the thrombin-binding site responsible for thrombin-catalyzed cleavage at Arg1689. *J Biol Chem.* 275(33):25774–80
- Nogami K, Shima M, Hosokawa K, Suzuki T, Koide T, et al. 1999. Role of factor VIII C2 domain in factor VIII binding to factor Xa. *J Biol Chem.* 274(43):31000–7
- Nogami K, Shima M, Nishiya K, Hosokawa K, Saenko EL, et al. 2002. A novel mechanism of factor VIII protection by von Willebrand factor from activated protein C-catalyzed inactivation. *Blood.* 99(11):3993–98
- Nogami K, Zhou Q, Myles T, Leung LLK, Wakabayashi H, Fay PJ. 2005. Exosite-interactive regions in the A1 and A2 domains of factor VIII facilitate thrombin-catalyzed cleavage of heavy chain. *J Biol Chem.* 280(18):18476–87
- Ober RJ, Martinez C, Lai X, Zhou J, Ward ES. 2004a. Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(30):11076–81
- Ober RJ, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Ward ES. 2004b. Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn. *J. Immunol.* 172(4):2021–29
- Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES. 2001. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int. Immunol.* 13(12):1551–59
- Oganesyan V, Damschroder MM, Cook KE, Li Q, Gao C, et al. 2014. Structural insights into neonatal Fc receptor-based recycling mechanisms. *J Biol Chem.* 289(11):7812–24
- O’Hara J, Hughes D, Camp C, Burke T, Carroll L, Diego D-AG. 2017. The cost of severe haemophilia in Europe: the CHESSE study. *Orphanet J Rare Dis.* 12(1):106

BIBLIOGRAPHIE

- O’Hear CE, Foote J. 2005. Antibody buffering of a ligand *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(1):40–44
- Ohnmacht C, Pullner A, King SBS, Drexler I, Meier S, et al. 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med.* 206(3):549–59
- Ohsaki A, Venturelli N, Buccigrosso TM, Osganian SK, Lee J, et al. 2018. Maternal IgG immune complexes induce food allergen-specific tolerance in offspring. *J. Exp. Med.* 215(1):91–113
- Oldenburg J, El-Maarri O, Schwaab R. 2002. Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. *Haemophilia.* 8(s2):23–29
- Oldenburg J, Levy GG. 2017. Efficacy of Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 377(22):2194–95
- Oldenburg J, Pavlova A. 2006. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia.* 12(s6):15–22
- Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E. 1997. HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost.* 77(2):238–42
- Oldenburg J, Schwaab R, Brackmann HH. 1999. Induction of immune tolerance in haemophilia A inhibitor patients by the “Bonn Protocol”: predictive parameter for therapy duration and outcome. *Vox Sang.* 77 Suppl 1:49–54
- Oliveira CA, Velloso-Rodrigues C, Machado FCJ, Carvalho BN, Gentz SHL, et al. 2013. Cytokine profile and FVIII inhibitors development in haemophilia A. *Haemophilia.* 19(3):e139-142
- Otto JC. 1996. An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families. *Clin Orthop Relat Res.* (328):4–6
- Overdijk MB, Verploegen S, Buijsse AO, Vink T, Leusen JHW, et al. 2012. Crosstalk between Human IgG Isotypes and Murine Effector Cells. *The Journal of Immunology*
- Øvlisen GO, Thygesen P, Weldingh KN, Bloem E, Skov S, et al. 2022. CTLA4-Ig prevents development of neutralizing antibody formation after continuous treatment with human FVIII in HA rats. *Haemophilia.* 28(4):568–77
- Padmanabhan A, Connelly-Smith L, Aqui N, Balogun RA, Klingel R, et al. 2019. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice - Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Eighth Special Issue. *J Clin Apher.* 34(3):171–354

BIBLIOGRAPHIE

- Pahl S, Pavlova A, Driesen J, Oldenburg J. 2014. Effect of F8 B domain gene variants on synthesis, secretion, activity and stability of factor VIII protein. *Thromb Haemost.* 111(1):58–66
- Pajot A, Pancré V, Fazilleau N, Michel M-L, Angyalosi G, et al. 2004. Comparison of HLA-DR1-restricted T cell response induced in HLA-DR1 transgenic mice deficient for murine MHC class II and HLA-DR1 transgenic mice expressing endogenous murine MHC class II molecules. *International Immunology.* 16(9):1275–82
- Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. 2012. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin. Dev. Immunol.* 2012:985646
- Pan J, Dinh TT, Rajaraman A, Lee M, Scholz A, et al. 2016. Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood.* 128(1):104–9
- Parg C, Jin M, Holsti M, Benard S, Rakhe S, et al. 2019. In Vitro and In Vivo Characterization of Marstacimab, an Anti-TFPI Antibody. *Blood.* 134:2391
- Parvathaneni K, Scott DW. 2018. Engineered FVIII-expressing cytotoxic T cells target and kill FVIII-specific B cells in vitro and in vivo. *Blood Adv.* 2(18):2332–40
- Pashov AD, Calvez T, Gilardin L, Maillère B, Repessé Y, et al. 2014. In silico calculated affinity of FVIII-derived peptides for HLA class II alleles predicts inhibitor development in haemophilia A patients with missense mutations in the F8 gene. *Haemophilia.* 20(2):176–84
- Pastorelli G, Rousset F, Pène J, Peronne C, Roncarolo MG, et al. 1990. Cord blood B cells are mature in their capacity to switch to IgE-producing cells in response to interleukin-4 in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 82(1):114–19
- Patek AJ, Taylor FHL. 1936. The Blood in Hemophilia. *Science.* 84(2177):271–72
- Pattinson JK, McVey JH, Boon M, Ajani A, Tuddenham EG. 1990. CRM+ haemophilia A due to a missense mutation (372----Cys) at the internal heavy chain thrombin cleavage site. *Br J Haematol.* 75(1):73–77
- Paveglia S, Puddington L, Rafti E, Matson AP. 2012. FcRn-mediated intestinal absorption of IgG anti-IgE/IgE immune complexes in mice. *Clin. Exp. Allergy.* 42(12):1791–1800
- Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S, Schwaab R, Mende M, et al. 2009. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor- α and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 7(12):2006–15
- Pavlova A, Zeitler H, Scharrer I, Brackmann H-H, Oldenburg J. 2010. HLA genotype in patients with acquired haemophilia A. *Haemophilia.* 16(102):107–12
- Pavlovsky A. 1947. Contribution to the pathogenesis of hemophilia. *Blood.* 2(2):185–91

BIBLIOGRAPHIE

Pearce EJ, Pearce EL. 2018. Immunometabolism in 2017: Driving immunity: all roads lead to metabolism. *Nat Rev Immunol*. 18(2):81–82

Pegon JN, Kurdi M, Casari C, Odouard S, Denis CV, et al. 2012. Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica*. 97(12):1855–63

Peng A, Kosloski MP, Nakamura G, Ding H, Balu-Iyer SV. 2011. PEGylation of a Factor VIII–Phosphatidylinositol Complex: Pharmacokinetics and Immunogenicity in Hemophilia A Mice. *AAPS J*. 14(1):35–42

Peng B, Ye P, Rawlings DJ, Ochs HD, Miao CH. 2009. Anti-CD3 antibodies modulate anti-factor VIII immune responses in hemophilia A mice after factor VIII plasmid-mediated gene therapy. *Blood*. 114(20):4373–82

Perrin GQ, Herzog RW, Markusic DM. 2019. Update on clinical gene therapy for hemophilia. *Blood*. 133(5):407–14

Peters RT, Low SC, Kamphaus GD, Dumont JA, Amari JV, et al. 2010. Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein. *Blood*. 115(10):2057–64

Peters RT, Toby G, Lu Q, Liu T, Kulman JD, et al. 2013. Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric factor VIII-Fc fusion protein. *J Thromb Haemost*. 11(1):132–41

Peyron I, Dimitrov JD, Delignat S, Gangadharan B, Planchais C, et al. 2015. Haemarthrosis and arthropathy do not favour the development of factor VIII inhibitors in severe haemophilia A mice. *Haemophilia*. 21(1):e94-98

Peyron I, Dimitrov JD, Delignat S, Gangadharan B, Srivastava A, et al. 2018. Oxidation of factor VIII increases its immunogenicity in mice with severe hemophilia A. *Cell Immunol*. 325:64–68

Peyvandi F, Mannucci PM, Garagiola I, El-Beshlawy A, Elalfy M, et al. 2016. A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A. *N Engl J Med*. 374(21):2054–64

Pfistershammer K, Stöckl J, Siekmann J, Turecek PL, Schwarz HP, Reipert BM. 2006. Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells. *Thromb Haemost*. 96(3):309–16

Piche-Nicholas NM, Avery LB, King AC, Kavosi M, Wang M, et al. 2018. Changes in complementarity-determining regions significantly alter IgG binding to the neonatal Fc receptor (FcRn) and pharmacokinetics. *MAbs*. 10(1):81–94

Pipe SW. 2008. Recombinant clotting factors. *Thromb Haemost*. 99(5):840–50

Pipe SW. 2009. Functional roles of the factor VIII B domain. *Haemophilia*. 15(6):1187–96

BIBLIOGRAPHIE

Pipe SW, Eickhorst AN, McKinley SH, Saenko EL, Kaufman RJ. 1999. Mild hemophilia A caused by increased rate of factor VIII A2 subunit dissociation: evidence for nonproteolytic inactivation of factor VIIIa in vivo. *Blood*. 93(1):176–83

Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. 2016. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood*. 128(16):2007–16

Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ. 1998. Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *J Biol Chem*. 273(14):8537–44

Pisal DS, Kosloski MP, Middaugh CR, Bankert RB, Balu-Iyer SV. 2012. Native-like aggregates of factor VIII are immunogenic in von Willebrand factor deficient and hemophilia a mice. *J Pharm Sci*. 101(6):2055–65

Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ. 1993. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood*. 81(11):2925–35

Plantier J-L, Guillet B, Ducasse C, Enjolras N, Rodriguez M-H, et al. 2005. B-domain deleted factor VIII is aggregated and degraded through proteasomal and lysosomal pathways. *Thromb Haemost*. 93(5):824–32

Platokouki H, Fischer K, Gouw SC, Rafowicz A, Carcao M, et al. 2018. Vaccinations are not associated with inhibitor development in boys with severe haemophilia A. *Haemophilia*. 24(2):283–90

Pohl ADP, Venkatesha SH, Zhang A-H, Scott DW. 2020. Suppression of FVIII-Specific Memory B Cells by Chimeric BAR Receptor-Engineered Natural Regulatory T Cells. *Front Immunol*. 11:693

Pollmann H, Richter H, Ringkamp H, Jürgens H. 1999. When are children diagnosed as having severe haemophilia and when do they start to bleed? A 10-year single-centre PUP study. *Eur J Pediatr*. 158(3):S166–70

Polte T, Hansen G. 2008. Maternal tolerance achieved during pregnancy is transferred to the offspring via breast milk and persistently protects the offspring from allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy*. 38(12):1950–58

Porada CD, Sanada C, Kuo C-J, Colletti E, Mandeville W, et al. 2011. Phenotypic correction of hemophilia A in sheep by postnatal intraperitoneal transplantation of FVIII-expressing MSC. *Exp Hematol*. 39(12):1124-1135.e4

Porada CD, Sanada C, Long CR, Wood JA, Desai J, et al. 2010. Clinical and molecular characterization of a re-established line of sheep exhibiting hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 8(2):276–85

BIBLIOGRAPHIE

Powell JS, Josephson NC, Quon D, Ragni MV, Cheng G, et al. 2012. Safety and prolonged activity of recombinant factor VIII Fc fusion protein in hemophilia A patients. *Blood*. 119(13):3031–37

Prabhat P, Gan Z, Chao J, Ram S, Vaccaro C, et al. 2007. Elucidation of intracellular recycling pathways leading to exocytosis of the Fc receptor, FcRn, by using multifocal plane microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(14):5889–94

Pradeu T, Jaeger S, Vivier E. 2013. The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? *Nat Rev Immunol*. 13(10):764–69

Pratt KP, Qian J, Ellaban E, Okita DK, Diethelm-Okita BM, et al. 2004. Immunodominant T-cell epitopes in the factor VIII C2 domain are located within an inhibitory antibody binding site. *Thromb Haemost*. 92(3):522–28

Qadura M, Waters B, Burnett E, Chegeni R, Hough C, et al. 2011. Immunoglobulin isotypes and functional anti-FVIII antibodies in response to FVIII treatment in Balb/c and C57BL/6 haemophilia A mice. *Haemophilia*. 17(2):288–95

Qian J, Borovok M, Bi L, Kazazian HH, Hoyer LW. 1999. Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb Haemost*. 81(2):240–44

Qian J, Burkly LC, Smith EP, Ferrant JL, Hoyer LW, et al. 2000. Role of CD154 in the secondary immune response: the reduction of pre-existing splenic germinal centers and anti-factor VIII inhibitor titer. *Eur J Immunol*. 30(9):2548–54

Qiao S-W, Kobayashi K, Johansen F-E, Sollid LM, Andersen JT, et al. 2008. Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(27):9337–42

Qin B, Wang J, Yang Z, Yang M, Ma N, et al. 2015. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis*. 74(11):1983–89

Qu J, Ma C, Xu X-Q, Xiao M, Zhang J, et al. 2020. Comparative glycosylation mapping of plasma-derived and recombinant human factor VIII. *PLoS ONE*. 15(5):e0233576

Raghavan M, Bonagura VR, Morrison SL, Bjorkman PJ. 1995. Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants. *Biochemistry*. 34(45):14649–57

Raghavan M, Chen MY, Gastinel LN, Bjorkman PJ. 1994. Investigation of the interaction between the class I MHC-related Fc receptor and its immunoglobulin G ligand. *Immunity*. 1(4):303–15

Raghavan M, Gastinel LN, Bjorkman PJ. 1993. The class I major histocompatibility complex related Fc receptor shows pH-dependent stability differences correlating with immunoglobulin binding and release. *Biochemistry*. 32(33):8654–60

BIBLIOGRAPHIE

Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry D, Madan B, et al. 2017. AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med.* 377(26):2519–30

Rao LV, Nordfang O, Hoang AD, Pendurthi UR. 1995. Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. *Blood.* 85(1):121–29

Rao VM, Rapaport SI. 1996. Cells and the Activation of Factor VII. *PHT.* 26(Suppl. 1):1–5

Rapaport SI, Ames SB, Mikkelsen S, Goodman JR. 1960. Plasma clotting factors in chronic hepatocellular disease. *N Engl J Med.* 263:278–82

Rasekh HR, Imani A, Karimi M, Golestani M. 2011. Cost-utility analysis of immune tolerance induction therapy versus on-demand treatment with recombinant factor VII for hemophilia A with high titer inhibitors in Iran. *Clinicoecon Outcomes Res.* 3:207–12

Rastegarlarlari G, Pegon JN, Casari C, Odouard S, Navarrete A-M, et al. 2012. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood.* 119(9):2126–34

Rath T, Baker K, Dumont JA, Peters RT, Jiang H, et al. 2015. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Critical Reviews in Biotechnology.* 35(2):235–54

Rawle FE, Pratt KP, Labelle A, Weiner HL, Hough C, Lillicrap D. 2006. Induction of partial immune tolerance to factor VIII through prior mucosal exposure to the factor VIII C2 domain. *J Thromb Haemost.* 4(10):2172–79

Rayes J, Ing M, Delignat S, Peyron I, Gilardin L, et al. 2018. Complement C3 is a novel modulator of the anti-factor VIII immune response. *Haematologica.* 103(2):351–60

Reding MT, Lei S, Lei H, Green D, Gill J, Conti-Fine BM. 2002. Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost.* 88(4):568–75

Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Anderson TA, Conti-Fine BM. 2003. Human CD4+ T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost.* 1(8):1777–84

Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Anderson TA, Conti-Fine BM. 2004. Epitope repertoire of human CD4(+) T cells on the A3 domain of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost.* 2(8):1385–94

Reding MT, Wu H, Krampf M, Okita DK, Diethelm-Okita BM, et al. 2000. Sensitization of CD4+ T cells to coagulation factor VIII: response in congenital and acquired hemophilia patients and in healthy subjects. *Thromb Haemost.* 84(4):643–52

BIBLIOGRAPHIE

- Reipert BM, Ahmad RU, Turecek PL, Schwarz HP. 2000. Characterization of antibodies induced by human factor VIII in a murine knockout model of hemophilia A. *Thromb. Haemost.* 84(5):826–32
- Reipert BM, Sasgary M, Ahmad RU, Auer W, Turecek PL, Schwarz HP. 2001. Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. *Thromb Haemost.* 86(6):1345–52
- Repešé Y, Dasgupta S, Navarrete A-M, Delignat S, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. 2012. Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 129(4):1172–73; author reply 1174-1175
- Repešé Y, Peyron I, Dimitrov JD, Dasgupta S, Moshai EF, et al. 2013. Development of inhibitory antibodies to therapeutic factor VIII in severe hemophilia A is associated with microsatellite polymorphisms in the HMOX1 promoter. *Haematologica.* 98(10):1650–55
- Reverdiau-Moalic P, Watier H, Vallée I, Lebranchu Y, Bardos P, Gruel Y. 1996. Comparative study of porcine and human blood coagulation systems: possible relevance in xenotransplantation. *Transplant Proc.* 28(2):643–44
- Richter AW, Akerblom E. 1984. Polyethylene glycol reactive antibodies in man: titer distribution in allergic patients treated with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens or placebo, and in healthy blood donors. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 74(1):36–39
- Riley RS, June CH, Langer R, Mitchell MJ. 2019. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov.* 18(3):175–96
- Rivera TL, Izmirly PM, Birnbaum BK, Byrne P, Brauth JB, et al. 2009. Disease progression in mothers of children enrolled in the Research Registry for Neonatal Lupus. *Ann. Rheum. Dis.* 68(6):828–35
- Robak T, Kaźmierczak M, Jarque I, Musteata V, Treliński J, et al. 2020. Phase 2 multiple-dose study of an FcRn inhibitor, rozanolixizumab, in patients with primary immune thrombocytopenia. *Blood Advances.* 4(17):4136–46
- Roberts DM, Guentert M, Rodewald R. 1990. Isolation and characterization of the Fc receptor from the fetal yolk sac of the rat. *J. Cell Biol.* 111(5 Pt 1):1867–76
- Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. 1998. Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia.* 4(4):331–34
- Rocino A, Cortesi PA, Scalone L, Mantovani LG, Crea R, et al. 2016. Immune tolerance induction in patients with haemophilia a and inhibitors: effectiveness and cost analysis in an European Cohort (The ITER Study). *Haemophilia.* 22(1):96–102

BIBLIOGRAPHIE

Rocino A, Santagostino E, Mancuso ME, Mannucci PM. 2006. Immune tolerance induction with recombinant factor VIII in hemophilia A patients with high responding inhibitors. *Haematologica*. 91(4):558–61

Rodewald R. 1973. Intestinal transport of antibodies in the newborn rat. *J. Cell Biol.* 58(1):189–211

Rodewald R. 1976. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. *J. Cell Biol.* 71(2):666–69

Rodewald R. 1980. Distribution of immunoglobulin G receptors in the small intestine of the young rat. *J. Cell Biol.* 85(1):18–32

Rodewald R, Kraehenbuhl JP. 1984. Receptor-mediated transport of IgG. *J. Cell Biol.* 99(1 Pt 2):159s–64

Ronayne EK, Peters SC, Gish JS, Wilson C, Spencer HT, et al. 2021. Structure of Blood Coagulation Factor VIII in Complex With an Anti-C2 Domain Non-Classical, Pathogenic Antibody Inhibitor. *Frontiers in Immunology*. 12:

Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, Brown AC, Akilesh S, et al. 2003. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J. Immunol.* 170(7):3528–33

Roovers RC, Laeremans T, Huang L, De Taeye S, Verkleij AJ, et al. 2007. Efficient inhibition of EGFR signaling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunol. Immunother.* 56(3):303–17

Rosendaal FR, Palla R, Garagiola I, Mannucci PM, Peyvandi F, SIPPET Study Group. 2017. Genetic risk stratification to reduce inhibitor development in the early treatment of hemophilia A: a SIPPET analysis. *Blood*. 130(15):1757–59

Rosner F. 1969. Hemophilia in the Talmud and rabbinic writings. *Ann Intern Med.* 70(4):833–37

Rossant J, Cross JC. 2001. Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet.* 2(7):538–48

Rossi G, Sarkar J, Scandella D. 2001. Long-term induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A. *Blood*. 97(9):2750–57

Rossini S, Noé R, Davenport V, Lecerf M, Justesen S, Dimitrov JD. 2020. V Region of IgG Controls the Molecular Properties of the Binding Site for Neonatal Fc Receptor. *The Journal of Immunology*

Roth GJ. 1992. Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunol Today.* 13(3):100–105

BIBLIOGRAPHIE

Rottensteiner H, Turecek PL, Pendu R, Meijer AB, Lenting P, et al. 2007. PEGylation or Polysialylation Reduces FVIII Binding to LRP Resulting in Prolonged Half-Life in Murine Models. *Blood*. 110(11):3150

Rottenstreich A, Zarbiv G, Oiknine-Djian E, Zigran R, Wolf DG, Porat S. 2021. Efficient Maternofetal Transplacental Transfer of Anti- Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Spike Antibodies After Antenatal SARS-CoV-2 BNT162b2 Messenger RNA Vaccination. *Clin Infect Dis*. 73(10):1909–12

Rueff-Juy D, Faure M, Drapier A-M, Cazenave P-A. 1998. Role of Maternal Ig in the Induction of Ck-Specific CD8+ T Cell Tolerance. *The Journal of Immunology*. 161(2):721–28

S S, R W, L R, P S, N G, et al. 2015. Physicochemical characterisation of rVIII-SingleChain, a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thrombosis research*. 136(2):

Sabatino DE, Freguia CF, Toso R, Santos A, Merricks EP, et al. 2009. Recombinant canine B-domain-deleted FVIII exhibits high specific activity and is safe in the canine hemophilia A model. *Blood*. 114(20):4562–65

Sabatino DE, Lange AM, Altynova ES, Sarkar R, Zhou S, et al. 2011. Efficacy and safety of long-term prophylaxis in severe hemophilia A dogs following liver gene therapy using AAV vectors. *Mol Ther*. 19(3):442–49

Saeland E, Vidarsson G, Leusen JHW, Garderen E van, Nahm MH, et al. 2003. Central Role of Complement in Passive Protection by Human IgG1 and IgG2 Anti-pneumococcal Antibodies in Mice. *The Journal of Immunology*. 170(12):6158–64

Saenko EL, Loster K, Josic D, Sarafanov AG. 1999. Effect of von Willebrand Factor and its proteolytic fragments on kinetics of interaction between the light and heavy chains of human factor VIII. *Thromb Res*. 96(5):343–54

Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ, Scandella D. 1994. A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 269(15):11601–5

Sakurai Y, Shima M, Tanaka I, Fukuda K, Yoshida K, Yoshioka A. 2004. Association of anti-idiotypic antibodies with immune tolerance induction for the treatment of hemophilia A with inhibitors. *Haematologica*. 89(6):696–703

Salomonsson S, Sonesson S-E, Ottosson L, Muhallab S, Olsson T, et al. 2005. Ro/SSA autoantibodies directly bind cardiomyocytes, disturb calcium homeostasis, and mediate congenital heart block. *J. Exp. Med*. 201(1):11–17

Sandberg H, Almstedt A, Brandt J, Castro VM, Gray E, et al. 2001. Structural and functional characterization of B-domain deleted recombinant factor VIII. *Semin Hematol*. 38(2 Suppl 4):4–12

BIBLIOGRAPHIE

Santagostino E, Mancuso ME, Rocino A, Mancuso G, Mazzucconi MG, et al. 2005. Environmental risk factors for inhibitor development in children with haemophilia A: a case-control study. *Br J Haematol*. 130(3):422–27

Santagostino E, Martinowitz U, Lissitchkov T, Pan-Petes B, Hanabusa H, et al. 2016. Long-acting recombinant coagulation factor IX albumin fusion protein (rIX-FP) in hemophilia B: results of a phase 3 trial. *Blood*. 127(14):1761–69

Sarachana T, Dahiya N, Simhadri VL, Pandey GS, Saini S, et al. 2015. Small ncRNA Expression-Profiling of Blood from Hemophilia A Patients Identifies miR-1246 as a Potential Regulator of Factor 8 Gene. *PLoS One*. 10(7):e0132433

Sarafanov AG, Makogonenko EM, Pechik IV, Radtke K-P, Khrenov AV, et al. 2006. Identification of coagulation factor VIII A2 domain residues forming the binding epitope for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Biochemistry*. 45(6):1829–40

Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, Wood CR. 2006. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Current Opinion in Biotechnology*. 17(6):638–42

Saxena R, Ranjan R. 2014. Prenatal Diagnosis of Hemophilia A and B. *J Mol Biol & Mol Imaging*. Volume 1(issue 2):7

Scallan CD, Jiang H, Liu T, Patarroyo-White S, Sommer JM, et al. 2006. Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood*. 107(5):1810–17

Scandella D, DeGraaf Mahoney S, Mattingly M, Roeder D, Timmons L, Fulcher CA. 1988. Epitope mapping of human factor VIII inhibitor antibodies by deletion analysis of factor VIII fragments expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(16):6152–56

Scandella D, Gilbert GE, Shima M, Nakai H, Eagleson C, et al. 1995. Some factor VIII inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain amino acids 2248 through 2312, which overlap a phospholipid-binding site. *Blood*. 86(5):1811–19

Scandella D, Mattingly M, de Graaf S, Fulcher CA. 1989. Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood*. 74(5):1618–26

Scandella D, Mattingly M, Prescott R. 1993. A recombinant factor VIII A2 domain polypeptide quantitatively neutralizes human inhibitor antibodies that bind to A2. *Blood*. 82(6):1767–75

Scandella DH, Nakai H, Felch M, Mondorf W, Scharrer I, et al. 2001. In hemophilia A and autoantibody inhibitor patients: the factor VIII A2 domain and light chain are most immunogenic. *Thromb Res*. 101(5):377–85

Schafer AI. 1997. Vascular endothelium: in defense of blood fluidity. *J Clin Invest*. 99(6):1143–44

BIBLIOGRAPHIE

- Schellenberger V, Wang C, Geething NC, Spink BJ, Campbell A, et al. 2009. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nat Biotechnol.* 27(12):1186–90
- Schlothauer T, Rueger P, Stracke JO, Hertenberger H, Fingas F, et al. 2013. Analytical FcRn affinity chromatography for functional characterization of monoclonal antibodies. *MAbs.* 5(4):576–86
- Schmidt A, Morales-Prieto DM, Pastuschek J, Fröhlich K, Markert UR. 2015. Only humans have human placentas: molecular differences between mice and humans. *J Reprod Immunol.* 108:65–71
- Schmidt MM, Townson SA, Andreucci AJ, King BM, Schirmer EB, et al. 2013. Crystal structure of an HSA/FcRn complex reveals recycling by competitive mimicry of HSA ligands at a pH-dependent hydrophobic interface. *Structure.* 21(11):1966–78
- Schmucker DL, Sanchez H. 2011. Liver Regeneration and Aging: A Current Perspective. *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2011:526379
- Schoch A, Kettenberger H, Mundigl O, Winter G, Engert J, et al. 2015. Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112(19):5997–6002
- Schuller DJ, Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL. 1999. Crystal structure of human heme oxygenase-1. *Nat Struct Mol Biol.* 6(9):860–67
- Schweiger H, Rejtő J, Hofbauer CJ, Berg V, Allacher P, et al. 2022. Nonneutralizing FVIII-specific antibody signatures in patients with hemophilia A and in healthy donors. *Blood Adv.* 6(3):946–58
- Scott DW, Pratt KP, Miao CH. 2013. Progress toward inducing immunologic tolerance to factor VIII. *Blood.* 121(22):4449–56
- Segal A, Zivelin A, Rosenberg N, Ginsburg D, Shpilberg O, Seligsohn U. 2004. A mutation in LMAN1 (ERGIC-53) causing combined factor V and factor VIII deficiency is prevalent in Jews originating from the island of Djerba in Tunisia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 15(1):99–102
- Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, Cooley B, Qin J, et al. 2015. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia. *Nat. Med.* 21(5):492–97
- Seligsohn U. 1973. Hemophilia and other clotting disorders. *Isr J Med Sci.* 9(9):1338–40
- Semmler-Behnke M, Lipka J, Wenk A, Hirn S, Schäffler M, et al. 2014. Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Part Fibre Toxicol.* 11:33

BIBLIOGRAPHIE

- Seth Chhabra E, Liu T, Kulman J, Patarroyo-White S, Yang B, et al. 2020. BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice. *Blood*. 135(17):1484–96
- Shahani T, Covens K, Lavend'homme R, Jazouli N, Sokal E, et al. 2014. Human liver sinusoidal endothelial cells but not hepatocytes contain factor VIII. *J. Thromb. Haemost.* 12(1):36–42
- Shahani T, Lavend'homme R, Luttun A, Saint-Remy J-M, Peerlinck K, Jacquemin M. 2010. Activation of human endothelial cells from specific vascular beds induces the release of a FVIII storage pool. *Blood*. 115(23):4902–9
- Shapiro SS. 1967. The Immunologic Character of Acquired Inhibitors of Antihemophilic Globulin (Factor VIII) and the Kinetics of Their Interaction with Factor VIII*. *J. Clin. Invest.* 46(2):147–56
- Shepherd AJ, Skelton S, Sansom CE, Gomez K, Moss DS, Hart DP. 2015. A large-scale computational study of inhibitor risk in non-severe haemophilia A. *British Journal of Haematology*. 168(3):413–20
- Sherman A, Su J, Lin S, Wang X, Herzog RW, Daniell H. 2014. Suppression of inhibitor formation against FVIII in a murine model of hemophilia A by oral delivery of antigens bioencapsulated in plant cells. *Blood*. 124(10):1659–68
- Shi Q, Carman CV, Chen Y, Sage PT, Xue F, et al. 2020a. Unexpected enhancement of FVIII immunogenicity by endothelial expression in lentivirus-transduced and transgenic mice. *Blood Adv.* 4(10):2272–85
- Shi Q, Mattson JG, Fahs SA, Geurts AM, Weiler H, Montgomery RR. 2020b. The severe spontaneous bleeding phenotype in a novel hemophilia A rat model is rescued by platelet FVIII expression. *Blood Adv.* 4(1):55–65
- Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, Fang J, Johnson BD, et al. 2007. Lentivirus-mediated platelet-derived factor VIII gene therapy in murine haemophilia A. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 5(2):352–61
- Shi Q, Wilcox DA, Fahs SA, Kroner PA, Montgomery RR. 2003. Expression of human factor VIII under control of the platelet-specific alphaIIb promoter in megakaryocytic cell line as well as storage together with VWF. *Mol Genet Metab.* 79(1):25–33
- Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, et al. 2001. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J. Biol. Chem.* 276(9):6591–6604
- Shima M, Scandella D, Yoshioka A, Nakai H, Tanaka I, et al. 1993. A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. *Thromb Haemost.* 69(3):240–46

BIBLIOGRAPHIE

- Shima M, Yoshioka A, Nakai H, Tanaka I, Sawamoto Y, et al. 1991. Epitope localization of monoclonal antibodies against factor VIII light chain which inhibit complex formation by factor VIII with von Willebrand factor. *Int J Hematol*. 54(6):515–22
- Shiraishi K, Yokoyama M. 2019. Toxicity and immunogenicity concerns related to PEGylated-micelle carrier systems: a review. *Sci Technol Adv Mater*. 20(1):324–36
- Shobe J, Dickinson CD, Edgington TS, Ruf W. 1999. Macromolecular substrate affinity for the tissue factor-factor VIIa complex is independent of scissile bond docking. *J Biol Chem*. 274(34):24171–75
- Siegrist CA. 2003. Mechanisms by which maternal antibodies influence infant vaccine responses: review of hypotheses and definition of main determinants. *Vaccine*. 21(24):3406–12
- Simister NE. 2003. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine*. 21(24):3365–69
- Simister NE, Mostov KE. 1989. An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature*. 337(6203):184–87
- Simister NE, Rees AR. 1985. Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. *Eur. J. Immunol*. 15(7):733–38
- Singleton TC, Keane M. 2012. Diagnostic and therapeutic challenges of intracranial hemorrhage in neonates with congenital hemophilia: a case report and review. *Ochsner J*. 12(3):249–53
- Smith B, Kiessling A, Lledo-Garcia R, Dixon KL, Christodoulou L, et al. 2018. Generation and characterization of a high affinity anti-human FcRn antibody, rozanolixizumab, and the effects of different molecular formats on the reduction of plasma IgG concentration. *MAbs*. 10(7):1111–30
- Smith MP, Spence KJ, Waters EL, Beresford-Webb R, Mitchell MJ, et al. 1999. Immune tolerance therapy for haemophilia A patients with acquired factor VIII alloantibodies: comprehensive analysis of experience at a single institution. *Thromb Haemost*. 81(1):35–38
- Smith SB, Gailani D. 2008. Update on the physiology and pathology of factor IX activation by factor XIa. *Expert Rev Hematol*. 1(1):87–98
- Sørensen KR, Roepstorff K, Wiinberg B, Hansen AK, Tranholm M, et al. 2016. The F8^{-/-} rat as a model of hemophilic arthropathy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 14(6):1216–25
- Sorvillo N, Hartholt RB, Bloem E, Sedek M, ten Brinke A, et al. 2016. von Willebrand factor binds to the surface of dendritic cells and modulates peptide presentation of factor VIII. *Haematologica*. 101(3):309–18

BIBLIOGRAPHIE

- Spena S, Garagiola I, Cannavò A, Mortarino M, Mannucci PM, et al. 2018. Prediction of factor VIII inhibitor development in the SIPPET cohort by mutational analysis and factor VIII antigen measurement. *J Thromb Haemost.* 16(4):778–90
- Spencer J, Perry ME, Dunn-Walters DK. 1998. Human marginal-zone B cells. *Immunol Today.* 19(9):421–26
- Spiegelberg HL, Weigle WO. 1965. THE CATABOLISM OF HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS 7S GAMMA GLOBULIN FRAGMENTS. *J. Exp. Med.* 121:323–38
- Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, et al. 2013. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia.* 19(1):e1–47
- Stapleton NM, Andersen JT, Stemerding AM, Bjarnarson SP, Verheul RC, et al. 2011. Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. *Nat Commun.* 2:599
- Stapleton NM, Armstrong-Fisher SS, Andersen JT, van der Schoot CE, Porter C, et al. 2018. Human IgG lacking effector functions demonstrate lower FcRn-binding and reduced transplacental transport. *Molecular Immunology.* 95:1–9
- Stasyshyn O, Djambas Khayat C, Iosava G, Ong J, Abdul Karim F, et al. 2017. Safety, efficacy and pharmacokinetics of rVIII-SingleChain in children with severe hemophilia A: results of a multicenter clinical trial. *J Thromb Haemost.* 15(4):636–44
- Steinitz KN, van Helden PM, Binder B, Wraith DC, Unterthurner S, et al. 2012. CD4+ T-cell epitopes associated with antibody responses after intravenously and subcutaneously applied human FVIII in humanized hemophilic E17 HLA-DRB1*1501 mice. *Blood.* 119(17):4073–82
- Stief TW, Kurz J, Doss MO, Fareed J. 2000. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood. *Thromb Res.* 97(6):473–80
- Story CM, Mikulska JE, Simister NE. 1994. A major histocompatibility complex class I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. *J. Exp. Med.* 180(6):2377–81
- Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, Mandapathil M, Whiteside TL. 2009. Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. *PLoS One.* 4(6):e5994
- Strohl WR. 2015. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs.* 29(4):215–39
- Su R-J, Epp A, Feng J, Roy J, Latchman Y, et al. 2011. Suppression of the Immune Response to FVIII in Hemophilia A Mice by Transgene Modified Tolerogenic Dendritic Cells. *Molecular Therapy.* 19(10):1896–1904

BIBLIOGRAPHIE

- Suzuki T, Ishii-Watabe A, Tada M, Kobayashi T, Kanayasu-Toyoda T, et al. 2010. Importance of Neonatal FcR in Regulating the Serum Half-Life of Therapeutic Proteins Containing the Fc Domain of Human IgG1: A Comparative Study of the Affinity of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins to Human Neonatal FcR. *J.I.* 184(4):1968–76
- Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, Kaufman RJ. 1997. Mutagenesis of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J Biol Chem.* 272(39):24121–24
- Swinkels M, Rijkers M, Voorberg J, Vidarsson G, Leebeek FWG, Jansen AJG. 2018. Emerging Concepts in Immune Thrombocytopenia. *Front. Immunol.* 9:
- Swystun L, Notley C, Georgescu I, Lai J, Nesbitt K, et al. 2019. The endothelial lectin clearance receptor CLEC4M binds and internalizes Factor VIII in a VWF-dependent and -independent manner. *J Thromb Haemost.* 17(4):681–94
- Swystun LL, Lai JD, Notley C, Georgescu I, Paine AS, et al. 2018. The endothelial cell receptor stabilin-2 regulates VWF-FVIII complex half-life and immunogenicity. *J Clin Invest.* 128(9):4057–73
- Szépfolusi Z, Loibichler C, Pichler J, Reisenberger K, Ebner C, Urbanek R. 2000. Direct evidence for transplacental allergen transfer. *Pediatr. Res.* 48(3):404–7
- Tagliavacca L, Moon N, Dunham WR, Kaufman RJ. 1997. Identification and functional requirement of Cu(I) and its ligands within coagulation factor VIII. *J Biol Chem.* 272(43):27428–34
- Takaba H, Takayanagi H. 2017. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* 38(11):805–16
- Tapia MD, Sow SO, Tamboura B, Tégueté I, Pasetti MF, et al. 2016. Maternal immunisation with trivalent inactivated influenza vaccine for prevention of influenza in infants in Mali: a prospective, active-controlled, observer-blind, randomised phase 4 trial. *Lancet Infect Dis.* 16(9):1026–35
- Tellez J, Van Vliet K, Tseng Y-S, Finn JD, Tschernia N, et al. 2013. Characterization of naturally-occurring humoral immunity to AAV in sheep. *PLoS One.* 8(9):e75142
- Teng C, Jiang C, Gao S, Liu X, Zhai S. 2021. Fetotoxicity of Nanoparticles: Causes and Mechanisms. *Nanomaterials (Basel).* 11(3):791
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. 1969. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 244(23):6388–94
- Teyssandier M, André S, Gupta N, Dasgupta S, Bayry J, et al. 2013. Therapeutic factor VIII does not trigger TLR1.2 and TLR2.6 signalling in vitro. *Haemophilia.* 19(3):399–402

BIBLIOGRAPHIE

- Thomas JR, Naidu P, Appios A, McGovern N. 2021. The Ontogeny and Function of Placental Macrophages. *Front Immunol.* 12:771054
- Tiede A, Brand B, Fischer R, Kavakli K, Lentz SR, et al. 2013. Enhancing the pharmacokinetic properties of recombinant factor VIII: first-in-human trial of glycoPEGylated recombinant factor VIII in patients with hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 11(4):670–78
- Tiegs G, Lohse AW. 2010. Immune tolerance: What is unique about the liver. *Journal of Autoimmunity.* 34(1):1–6
- Timofeev VP, Dudich IV, Sykulev YK, Nezlin RS. 1978. Rotational correlation times of IgG and its fragments spin-labeled at carbohydrate or protein moieties. Spatially fixed position of the Fc carbohydrate. *FEBS Lett.* 89(2):191–95
- Tinlin S, Webster S, Giles AR. 1993. The development of homologous (canine/anti-canine) antibodies in dogs with haemophilia A (factor VIII deficiency): a ten-year longitudinal study. *Thromb Haemost.* 69(1):21–24
- Tiwari B, Junghans RP. 2005. Functional analysis of the mouse Fcγt 5' proximal promoter. *Biochim. Biophys. Acta.* 1681(2–3):88–98
- Toole JJ, Knopf JL, Wozney JM, Sultzman LA, Buecker JL, et al. 1984. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature.* 312(5992):342–47
- Top O, Geisen U, Decker EL, Reski R. 2019. Critical Evaluation of Strategies for the Production of Blood Coagulation Factors in Plant-Based Systems. *Front Plant Sci.* 10:261
- Trujillo JA, Croft NP, Dudek NL, Channappanavar R, Theodossis A, et al. 2014. The cellular redox environment alters antigen presentation. *J Biol Chem.* 289(40):27979–91
- Tse WH, Higgins S, Patel D, Xing M, West AR, et al. 2022. The maternal-fetal transfer of passive immunity as a mechanism of transplacental nanoparticle drug delivery for prenatal therapies. *Biomater Sci.* 10(18):5243–53
- Turco MY, Gardner L, Kay RG, Hamilton RS, Prater M, et al. 2019. Trophoblast organoids as a model for maternal-fetal interactions during human placentation. *Nature.* 564(7735):263–67
- Turecek PL, Varadi K, Gritsch H, Auer W, Pichler L, et al. 1999. Factor Xa and Prothrombin: Mechanism of Action of FEIBA. *VOX.* 77(Suppl. 1):72–79
- Turecek PL, Váradi K, Gritsch H, Schwarz HP. 2004. FEIBA®: mode of action. *Haemophilia.* 10(s2):3–9
- Turecek PL, Váradi K, Keil B, Negrier C, Berntorp E, et al. 2003. Factor VIII inhibitor-bypassing agents act by inducing thrombin generation and can be monitored by a thrombin generation assay. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 33(1):16–22

BIBLIOGRAPHIE

- Türkantoz H, Königs C, Knöbl P, Klamroth R, Holstein K, et al. 2020. Cross-reacting inhibitors against recombinant porcine factor VIII in acquired hemophilia A: Data from the GTH-AH 01/2010 Study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 18(1):36–43
- Ulrichts P, Guglietta A, Dreier T, van Bragt T, Hanssens V, et al. 2018. Neonatal Fc receptor antagonist efgartigimod safely and sustainably reduces IgGs in humans. *J. Clin. Invest.* 128(10):4372–86
- Vaccaro C, Bawdon R, Wanjie S, Ober RJ, Ward ES. 2006. Divergent activities of an engineered antibody in murine and human systems have implications for therapeutic antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(49):18709–14
- Valdor R, Macian F. 2010. Mechanisms of self-inactivation in anergic T cells. *Inmunologia*. 29(1):20–33
- Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, et al. 2021. Characterization of the neutralizing anti-emicizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 19(3):711–18
- van Baren N, Van den Eynde BJ. 2015. Tumoral Immune Resistance Mediated by Enzymes That Degrade Tryptophan. *Cancer Immunol Res*. 3(9):978–85
- van den Berg HM, Fischer K, Carcao M, Chambost H, Kenet G, et al. 2019. Timing of inhibitor development in more than 1000 previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood*. 134(3):317–20
- Van Den Berg HM, Fischer K, Roosendaal G, Mauser-Bunschoten EP. 1998. The use of the Port-A-Cath in children with haemophilia--a review. *Haemophilia*. 4(4):418–20
- van den Berg JP, Westerbeek E a. M, van der Klis FRM, Berbers G a. M, van Elburg RM. 2011. Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Hum. Dev.* 87(2):67–72
- van den Brink EN, Turenhout EA, Bank CM, Fijnvandraat K, Peters M, Voorberg J. 2000a. Molecular analysis of human anti-factor VIII antibodies by V gene phage display identifies a new epitope in the acidic region following the A2 domain. *Blood*. 96(2):540–45
- van den Brink EN, Turenhout EA, Bovenschen N, Heijnen BG, Mertens K, et al. 2001. Multiple VH genes are used to assemble human antibodies directed toward the A3-C1 domains of factor VIII. *Blood*. 97(4):966–72
- van den Brink EN, Turenhout EAM, Davies J, Bovenschen N, Fijnvandraat K, et al. 2000b. Human antibodies with specificity for the C2 domain of factor VIII are derived from VH1 germline genes. *Blood*. 95(2):558–63

BIBLIOGRAPHIE

- van der Bom JG, Mauser-Bunschoten EP, Fischer K, van den Berg HM. 2003. Age at first treatment and immune tolerance to factor VIII in severe hemophilia. *Thromb Haemost.* 89(3):475–79
- Van Duren-Schmidt K, Pichler J, Ebner C, Bartmann P, Förster E, et al. 1997. Prenatal contact with inhalant allergens. *Pediatr. Res.* 41(1):128–31
- van Haren SD, Herczenik E, ten Brinke A, Mertens K, Voorberg J, Meijer AB. 2011. HLA-DR-presented peptide repertoires derived from human monocyte-derived dendritic cells pulsed with blood coagulation factor VIII. *Mol Cell Proteomics.* 10(6):M110.002246
- van Haren SD, Wroblewska A, Herczenik E, Kaijen PH, Ruminska A, et al. 2013. Limited promiscuity of HLA-DRB1 presented peptides derived of blood coagulation factor VIII. *PLoS One.* 8(11):e80239
- van Helden PMW, Kaijen PHP, Fijnvandraat K, van den Berg HM, Voorberg J. 2007. Factor VIII-specific memory B cells in patients with hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 5(11):2306–8
- van Helden PMW, Kaijen PHP, Mauser-Bunschoten EP, Fischer K, van den Berg HM, Voorberg J. 2010. Domain specificity of factor VIII inhibitors during immune tolerance induction in patients with haemophilia A. *Haemophilia.* 16(6):892–901
- van Helden PMW, van den Berg HM, Gouw SC, Kaijen PHP, Zuurveld MG, et al. 2008. IgG subclasses of anti-FVIII antibodies during immune tolerance induction in patients with hemophilia A. *British Journal of Haematology.* 142(4):644–52
- Van Roy M, Ververken C, Beirnaert E, Hoefman S, Kolkman J, et al. 2015. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 17:135
- Van Savage J, Decker MD, Edwards KM, Sell SH, Karzon DT. 1990. Natural history of pertussis antibody in the infant and effect on vaccine response. *J. Infect. Dis.* 161(3):487–92
- van Schooten CJ, Shahbazi S, Groot E, Oortwijn BD, van den Berg HM, et al. 2008. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood.* 112(5):1704–12
- van 't Veer C, Golden NJ, Mann KG. 2000. Inhibition of thrombin generation by the zymogen factor VII: implications for the treatment of hemophilia A by factor VIIa. *Blood.* 95(4):1330–35
- Varadi K, Tangada S, Loeschberger M, Montsch P, Schrenk G, et al. 2016. Pro- and anticoagulant factors facilitate thrombin generation and balance the haemostatic response to FEIBA® in prophylactic therapy. *Haemophilia.* 22(4):615–24
- Vaughn DE, Bjorkman PJ. 1998. Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor. *Structure.* 6(1):63–73

BIBLIOGRAPHIE

- Vaughn DE, Milburn CM, Penny DM, Martin WL, Johnson JL, Bjorkman PJ. 1997. Identification of critical IgG binding epitopes on the neonatal Fc receptor. *J. Mol. Biol.* 274(4):597–607
- Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, et al. 1984. Structure of human factor VIII. *Nature.* 312(5992):337–42
- Veltkamp JJ, Asfaou E, van de Torren K, van der Does JA, van Tilburg NH, Pauwels EK. 1974. Extrahepatic factor VIII synthesis. Lung transplants in hemophilic dogs. *Transplantation.* 18(1):56–62
- Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. 1995. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost.* 73(2):247–51
- Verhasselt V, Milcent V, Cazareth J, Kanda A, Fleury S, et al. 2008. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nat. Med.* 14(2):170–75
- Veronese FM, Pasut G. 2005. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today.* 10(21):1451–58
- Vidarsson G, Dekkers G, Rispen T. 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 5:520
- Vidarsson G, Stemmerding AM, Stapleton NM, Spliethoff SE, Janssen H, et al. 2006. FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role in phagocytosis. *Blood.* 108(10):3573–79
- Vlot AJ, Koppelman SJ, van den Berg MH, Bouma BN, Sixma JJ. 1995. The affinity and stoichiometry of binding of human factor VIII to von Willebrand factor. *Blood.* 85(11):3150–57
- Vlot AJ, Mauser-Bunschoten EP, Zarkova AG, Haan E, Kruitwagen CL, et al. 2000. The half-life of infused factor VIII is shorter in hemophiliac patients with blood group O than in those with blood group A. *Thromb Haemost.* 83(1):65–69
- Vollack N, Friese J, Bergmann S, Cragg MS, Tiede A, Werwitzke S. 2017. Anti-FcγRIIB (CD32) Antibodies Differentially Modulate Murine FVIII-Specific Recall Response in vitro. *Scand J Immunol.* 86(2):91–99
- Vos T, Lim SS, Abbafati C, Abbas KM, Abbasi M, et al. 2020. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet.* 396(10258):1204–22
- Vyas AK, Sharma BC, Sarin SK, Trehanpati N. 2018. Immune correlates of hepatitis B surface antigen spontaneous seroconversion in hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B patients. *Liver Int.* 38(1):38–49

BIBLIOGRAPHIE

- Wadhwa M, Dilger P, Tubbs J, Mire-Sluis A, Barrowcliffe T, Thorpe R. 1994. Identification of Transforming Growth Factor- β as a Contaminant in Factor VIII Concentrates: A Possible Link With Immunosuppressive Effects in Hemophiliacs. *Blood*. 84(6):2021–30
- Wakabayashi H, Koszelak ME, Mastri M, Fay PJ. 2001. Metal Ion-independent Association of Factor VIII Subunits and the Roles of Calcium and Copper Ions for Cofactor Activity and Inter-Subunit Affinity. *Biochemistry*. 40(34):10293–300
- Wang W, Lu P, Fang Y, Hamuro L, Pittman T, et al. 2011a. Monoclonal antibodies with identical Fc sequences can bind to FcRn differentially with pharmacokinetic consequences. *Drug Metab. Dispos*. 39(9):1469–77
- Wang Y. 2010. Vascular Biology of the Placenta. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*. 2(1):1–98
- Wang Y, Camirand G, Lin Y, Froicu M, Deng S, et al. 2011b. Regulatory T Cells Require Mammalian Target of Rapamycin Signaling To Maintain Both Homeostasis and Alloantigen-Driven Proliferation in Lymphocyte-Replete Mice. *The Journal of Immunology*
- Ward ES, Martinez C, Vaccaro C, Zhou J, Tang Q, Ober RJ. 2005. From sorting endosomes to exocytosis: association of Rab4 and Rab11 GTPases with the Fc receptor, FcRn, during recycling. *Mol. Biol. Cell*. 16(4):2028–38
- Ward ES, Zhou J, Ghetie V, Ober RJ. 2003. Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *Int. Immunol*. 15(2):187–95
- Ward NJ, Buckley SMK, Waddington SN, Vandendriessche T, Chuah MKL, et al. 2011. Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood*. 117(3):798–807
- Ware JA, Heistad DD. 1993. Platelet-Endothelium Interactions. *New England Journal of Medicine*. 328(9):628–35
- Wassef L, Shete V, Hong A, Spiegler E, Quadro L. 2012. β -Carotene supplementation decreases placental transcription of LDL receptor-related protein 1 in wild-type mice and stimulates placental β -carotene uptake in marginally vitamin A-deficient mice. *J Nutr*. 142(8):1456–62
- Watabe H, Gitlin JL, Gitlin D. 1980. Further characterization of IgG receptors from human placenta. *J. Biochem*. 87(2):393–97
- Waters B, Qadura M, Burnett E, Chegeni R, Labelle A, et al. 2009. Anti-CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4+CD25+-dependent mechanism and by shifting cytokine production to favor a Th1 response. *Blood*. 113(1):193–203
- Webster WP, Zukoski CF, Hutchin P, Reddick RL, Mandel SR, Penick GD. 1971. Plasma factor VIII synthesis and control as revealed by canine organ transplantation. *Am J Physiol*. 220(5):1147–54

BIBLIOGRAPHIE

Weflen AW, Baier N, Tang Q-J, Van den Hof M, Blumberg RS, et al. 2013. Multivalent immune complexes divert FcRn to lysosomes by exclusion from recycling sorting tubules. *Mol Biol Cell*. 24(15):2398–2405

Weiskopf D, Schwanninger A, Weinberger B, Almanzar G, Parson W, et al. 2010. Oxidative stress can alter the antigenicity of immunodominant peptides. *J Leukoc Biol*. 87(1):165–72

Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. 1977. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest*. 60(2):390–404

Wenande E, Garvey LH. 2016. Immediate-type hypersensitivity to polyethylene glycols: a review. *Clinical & Experimental Allergy*. 46(7):907–22

Weng J, Tong HHY, Chow SF. 2020. In Vitro Release Study of the Polymeric Drug Nanoparticles: Development and Validation of a Novel Method. *Pharmaceutics*. 12(8):E732

Whelan SFJ, Hofbauer CJ, Horling FM, Allacher P, Wolfsegger MJ, et al. 2013. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood*. 121(6):1039–48

White GC, McMillan CW, Kingdon HS, Shoemaker CB. 1989. Use of recombinant antihemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia. *N Engl J Med*. 320(3):166–70

Wichmann HE. 1996. Possible explanation for the different trends of asthma and allergy in East and West Germany. *Clin. Exp. Allergy*. 26(6):621–23

Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, et al. 2010. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ Health Perspect*. 118(3):432–36

Wiley LM. 1988. Trophectoderm: the first epithelium to develop in the mammalian embryo. *Scanning Microsc*. 2(1):417–26

Winkel LPF, Van den Hout JMP, Kamphoven JHJ, Disseldorp JAM, Remmerswaal M, et al. 2004. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe's disease: a three-year follow-up. *Ann. Neurol*. 55(4):495–502

Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. 1985. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*. 317(6039):726–29

Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, Eaton DL, Gitschier J, et al. 1984. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature*. 312(5992):330–37

Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, et al. 2006. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Exp. Med*. 203(3):519–27

BIBLIOGRAPHIE

- Wraith JE. 2002. Lysosomal disorders. *Semin Neonatol.* 7(1):75–83
- Wroblewska A, van Haren SD, Herczenik E, Kaijen P, Ruminska A, et al. 2012. Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. *Blood.* 119(22):5294–5300
- Wu H, Reding M, Qian J, Okita DK, Parker E, et al. 2001. Mechanism of the immune response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb. Haemost.* 85(1):125–33
- Wu Z, Yang H, Colosi P. 2010. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther.* 18(1):80–86
- Xie FT, Cao JS, Zhao J, Yu Y, Qi F, Dai XC. 2015. IDO expressing dendritic cells suppress allograft rejection of small bowel transplantation in mice by expansion of Foxp3+ regulatory T cells. *Transpl Immunol.* 33(2):69–77
- Xing Y, Hogquist KA. 2012. T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4(6):a006957
- Yada A, Ebihara S, Matsumura K, Endo S, Maeda T, et al. 2003. Accelerated antigen presentation and elicitation of humoral response in vivo by FcγRIIB- and FcγRI/III-mediated immune complex uptake. *Cell Immunol.* 225(1):21–32
- Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. 1994. Distribution and Tissue Uptake of Poly(ethylene glycol) with Different Molecular Weights after Intravenous Administration to Mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 83(4):601–6
- Yang D, Giragossian C, Castellano S, Lasaro M, Xiao H, et al. 2017. Maximizing in vivo target clearance by design of pH-dependent target binding antibodies with altered affinity to FcRn. *MAbs.* 9(7):1105–17
- Yoon J, Schmidt A, Zhang A-H, Königs C, Kim YC, Scott DW. 2017. FVIII-specific human chimeric antigen receptor T-regulatory cells suppress T- and B-cell responses to FVIII. *Blood.* 129(2):238–45
- Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, et al. 2004. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity.* 20(6):769–83
- Yoshida M, Kobayashi K, Kuo TT, Bry L, Glickman JN, et al. 2006a. Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J. Clin. Invest.* 116(8):2142–51
- Yoshida M, Masuda A, Kuo TT, Kobayashi K, Claypool SM, et al. 2006b. IgG transport across mucosal barriers by neonatal Fc receptor for IgG and mucosal immunity. *Springer Semin. Immunopathol.* 28(4):397–403

BIBLIOGRAPHIE

- Young G, Mahlangu J, Kulkarni R, Nolan B, Liesner R, et al. 2015. Recombinant factor VIII Fc fusion protein for the prevention and treatment of bleeding in children with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost.* 13(6):967–77
- Zalevsky J, Chamberlain AK, Horton HM, Karki S, Leung IWL, et al. 2010. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat Biotechnol.* 28(2):157–59
- Zambidis ET, Scott DW. 1996. Epitope-specific tolerance induction with an engineered immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(10):5019–24
- Zanatta E, Cozzi M, Marson P, Cozzi F. 2019. The role of plasma exchange in the management of autoimmune disorders. *British Journal of Haematology.* 186(2):207–19
- Zanolini D, Merlin S, Feola M, Ranaldo G, Amoruso A, et al. 2015. Extrahepatic sources of factor VIII potentially contribute to the coagulation cascade correcting the bleeding phenotype of mice with hemophilia A. *Haematologica.* 100(7):881–92
- Zerra PE, Arthur CM, Chonat S, Maier CL, Mener A, et al. 2020. Fc Gamma Receptors and Complement Component 3 Facilitate Anti-FVIII Antibody Formation. *Frontiers in Immunology.* 11:
- Zerra PE, Cox C, Baldwin WH, Patel SR, Arthur CM, et al. 2017. Marginal zone B cells are critical to factor VIII inhibitor formation in mice with hemophilia A. *Blood.* 130(23):2559–68
- Zhang A-H, Rossi RJ, Yoon J, Wang H, Scott DW. 2016. Tolerogenic nanoparticles to induce immunologic tolerance: Prevention and reversal of FVIII inhibitor formation. *Cell Immunol.* 301:74–81
- Zhang A-H, Skupsky J, Scott DW. 2011. Effect of B-cell depletion using anti-CD20 therapy on inhibitory antibody formation to human FVIII in hemophilia A mice. *Blood.* 117(7):2223–26
- Zhang A-H, Yoon J, Kim YC, Scott DW. 2018. Targeting Antigen-Specific B Cells Using Antigen-Expressing Transduced Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology.* 201(5):1434–41
- Zhang Y-H, Aldo P, You Y, Ding J, Kaislasuo J, et al. 2020. Trophoblast-secreted soluble-PD-L1 modulates macrophage polarization and function. *Journal of Leukocyte Biology.* 108(3):983–98
- Zheng C, Liu H, Ginsburg D, Zhang B. 2009. Critical Role of Calcium in the Regulation of the ER-to-Golgi Transport of FV and FVIII by the LMAN1-MCFD2 Cargo Receptor. *Blood.* 114(22):2140
- Zhong D, Saenko EL, Shima M, Felch M, Scandella D. 1998. Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood.* 92(1):136–42
- Zhou B, Weigel JA, Fauss L, Weigel PH. 2000. Identification of the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). *J Biol Chem.* 275(48):37733–41

BIBLIOGRAPHIE

Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, et al. 2001. MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* 166(5):3266–76

Zollner S, Raquet E, Claar P, Müller-Cohrs J, Metzner HJ, et al. 2014. Non-clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of rVIII-SingleChain, a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res.* 134(1):125–31

Zolotukhin I, Markusic DM, Palaschak B, Hoffman BE, Srikanthan MA, Herzog RW. 2016. Potential for cellular stress response to hepatic factor VIII expression from AAV vector. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 3:16063

Le transfert transplacentaire d'immunoglobulines G (IgG) maternelles, médié par le récepteur Fc néonatal (FcRn), protège le fœtus/nouveau-né contre les infections durant la maturation de son système immunitaire. Cette interface privilégiée entre la mère et l'enfant a été exploitée pour différentes intentions thérapeutiques comme par exemple dans le cadre de la vaccination ; ou au sein de modèles pré-cliniques, lors du remplacement *in utero* d'enzymes essentielles absentes, ou encore pour modeler les répertoires immunitaires adaptatifs du fœtus, favorisant ainsi le développement d'une tolérance aux protéines du soi.

Le but de mon projet de thèse était de déterminer si l'établissement d'une tolérance spécifique pour une protéine du soi, non exprimée par la descendance, pouvait être induite pendant la vie fœtale. C'est par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques administrés lors de la grossesse, que cette protéine serait transférée au fœtus, et permettrait d'induire une tolérance immunitaire spécifique et de prévenir l'apparition d'une réponse immunitaire adaptative plus tard dans la vie.

L'hémophilie A a été choisie comme modèle clinique pour tester cette hypothèse. Cette maladie hémorragique rare liée au chromosome X est causée par un déficit en facteur VIII (FVIII) pro-coagulant. Les patients hémophiles A développent, selon la gravité de leur pathologie, des saignements spontanés ou provoqués dans les organes internes et les articulations. Afin de prévenir ou de traiter les saignements, des molécules de FVIII substitutives sont fréquemment administrées aux patients. Néanmoins, le problème majeur de ces traitements est le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII, se traduisant par l'apparition d'IgGs inhibitrices de l'activité pro-coagulante du FVIII ; ces IgGs rendent les traitements substitutifs inefficaces. Le développement de la réponse immunitaire anti-FVIII repose en partie sur une absence d'établissement de tolérance centrale et/ou périphérique au FVIII chez les patients.

En exploitant la capacité du FcRn à transférer les IgGs maternelles vers le sang fœtal, nous aspirions à favoriser le transfert de FVIII maternel vers la circulation fœtale et ainsi induire une tolérance envers le FVIII thérapeutique. Au cours de mon travail, j'ai généré des anticorps monovalents humains (FabFc) capables de fixer le FVIII humain et de le transférer au sein d'une descendance hémophile A, de manière dépendante au FcRn. Après avoir validé le transfert transplacentaire de molécules thérapeutiques, j'ai étudié si l'exposition aux antigènes du FVIII lors de l'ontogénie des lymphocytes T, favorisait le développement d'une tolérance immunitaire spécifique. Mes résultats ont identifié les paramètres influant le transfert transplacentaire de molécules thérapeutiques ainsi que ceux pouvant impacter l'induction de tolérance immunitaire pendant le stade fœtal. Ce projet de recherche apporte ainsi une preuve de concept sur le transfert efficace d'antigènes via des FabFc de la circulation maternelle vers la circulation fœtale