



HAL
open science

Les signaux de danger dans l'initiation de la réponse immunitaire contre le facteur VIII thérapeutique

Maud Teyssandier

► **To cite this version:**

Maud Teyssandier. Les signaux de danger dans l'initiation de la réponse immunitaire contre le facteur VIII thérapeutique. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66476 . tel-00839224

HAL Id: tel-00839224

<https://theses.hal.science/tel-00839224>

Submitted on 27 Jun 2013

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

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

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

Spécialité :

IMMUNOLOGIE

Ecole doctorale : Physiologie et physiopathologie

Présentée par :

Maud TEYSSANDIER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI

Sujet de la thèse

**LES SIGNAUX DE DANGER DANS L'INITIATION DE LA
REPOSE IMMUNITAIRE CONTRE LE FACTEUR VIII
THERAPEUTIQUE**

Soutenue le 25 septembre 2012

devant le jury composé de :

Mme Isabelle CREMER , Professeur, Université Paris VI	(Présidente)
Mr Bernard MAILLERE , Directeur de Recherche, CEA	(Rapporteur)
Mr Jean-Philippe ROSA , Directeur de Recherche, INSERM	(Rapporteur)
Mr Olivier CHRISTOPHE , Chargé de Recherche, INSERM	(Examineur)
Mme Roseline D'OIRON , Médecin, Hôpital Bicêtre	(Examineur)
Mr Sébastien LACROIX-DESMAZES , Directeur de recherche, CNRS	(Directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier Mr Rosa et Mr Maillère d'avoir accepté de rapporter cette thèse en ces mois peu favorables à la concentration que sont juillet et août. J'ai été réellement honorée par toute l'attention et le sérieux avec lesquels vous avez évalué mon travail et je vous suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier de vos connaissances et de vos conseils. Merci également à Mme Cremer, Mme D'Oiron et Mr Christophe, respectivement présidente et examinateurs, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à Srinu Kaveri, directeur du laboratoire que j'ai rejoint il y a maintenant cinq ans, le « jedi » de l'injection rétro-orbitale, l'homme qui murmurait à l'oreille des souris, mon professeur de culture orientale. Malheureusement cinq années n'auront pas suffi à me convertir à la gastronomie indienne : mon génome ne possède probablement pas la mutation indispensable qui confère une insensibilité papillaire suffisante pour supporter une telle chaleur !

Sébastien, que dire... J'ai l'impression que mes différents projets et moi-même ne t'avons pas ménagé ces quatre dernières années. Pour autant, je n'ai pas pu observer une recrudescence de cheveux blancs sur ta tête : on se demande pourquoi ! Trêve de plaisanteries, je sais toute l'implication professionnelle et affective que tu accordes à chacun de tes étudiants en général, et celle que tu m'as accordée en particulier. J'aime ta franchise et ta façon d'aller droit au but, moins les excès qui en résultent mais vraisemblablement, c'est dans le lot : deux achetés, un offert ! Merci pour tout ce que tu m'as appris, tout ce que tu m'as donné et tout ce
REF_205" \o "Park, 2011 #200" ¶205, ^ !! HYPERLINK \l "_ENREF_206" \o "Kataoka, 2003 #201" ¶206]^ ¶ !! ¶arti ce qui m'a permis de tenir jusqu'au bout.

Parmi les nombreux enseignements que j'ai pu tirer au cours de cette thèse, le plaisir de travailler au quotidien avec des femmes en fut un assez surprenant. C'est pourquoi j'aimerais remercier trois femmes extraordinaires qui m'ont apporté un immense soutien, toutes à leur façon.

Difficile de ne pas commencer par toi, Sandrine, ma sauveuse. Avec toi j'ai appris à quel point le travail d'équipe pouvait être épanouissant, tu as su m'orienter et me stimuler sans jamais me commander ou m'accabler, un véritable travail de virtuose. Ton rôle est immense dans l'aboutissement de cette thèse aussi, pour cela et tout le reste : merci.

Ana-Maria, quelques mots pour te remercier de ton amitié, de ton empathie sans limite et de ta générosité. Merci d'avoir été d'un tel soutien au cours d'une période très difficile, le deseo todo lo mejor en su vida.

Marie-Françoise, la fée du labo, je te remercie bien évidemment pour tous les services que tu m'as rendus mais je tiens surtout à te remercier d'avoir partagé avec moi des moments plus personnels : nos petits interludes vont me manquer.

Place aux hommes maintenant, le troupeau de thésards masculins de l'équipe FVIII, la dream team dont j'assume le commandement jusqu'à mon dernier jour ! Yohann, tu n'as pas eu la chance de connaître l'ère Maud-sama mais tu sais déjà que tu as trouvé ton maître dans le

domaine très pointu des génériques de dessin-animés. En revanche, toi-seul savais me mettre d'horribles chansons dans la tête, alors merci du fond du cœur d'avoir rythmé mes journées. Yann, mon aîné, celui qui a fait tout comme moi mais avec un an d'avance : merci de m'avoir tracé la route ; je t'ai quand même devancé pour le mariage et le bébé : la course continue... Cyril, sans doute l'étudiant avec lequel j'ai créé des liens le plus rapidement : une bonne humeur, un sens de l'écoute et une tête de bois, tout cela à la fois ! Merci d'avoir été mon compagnon de route ces trois dernières années. Ivan, probablement la personne dont la personnalité est la plus proche de la mienne, ce qui ne facilite pas forcément un rapprochement rapide, mais on a fini par se connecter, nous les méchants sans pitié. Je te passe les clefs du zoo : la remise de fouet se fera à mon départ ! Laurent, petit dernier de la famille, mon dealer de Plavix (entre autres), mon pote de galère les week-ends au labo, merci pour tous les services que tu m'as rendu en si peu de temps.

Merci à iSeb de m'avoir fait faire mes premiers pas à la paillasse et d'avoir assuré la formation pré-thèse. Je te dois une large majorité de mes connaissances en biologie moléculaire ainsi qu'une autonomie acquise très rapidement. Merci pour ton enthousiasme et ta motivation à transmettre. Bonne chance dans ton nouveau labo.

Merci à Jag et Julie de m'avoir fréquemment apporté leurs lumières dans des domaines que je ne maîtrise pas. Merci à tous les étudiants étrangers de m'avoir fait découvrir d'autres cultures. Et merci à Justa et Mr Sonte pour leur gentillesse et leur travail d'une grande valeur pour la bonne marche du laboratoire.

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier ma famille, celle qui m'a offert les cartes que j'ai actuellement en mains pour construire ma vie d'adulte. Maman, Papa, Mamée, Papé : mes éducateurs, mes racines, mes sources inépuisables d'amour et de tendresse, je vous dédie cette thèse. Cyril, ton exemple a largement façonné ma manière d'aborder autrui, un beau cadeau pour ta petite sœur.

Je remercie également « ma » petite famille : Jessie, je ne sais pas si je peux te remercier pour ton aide au cours des 18 derniers mois de ma thèse, on ne peut pas dire que tu ais été très efficace... En revanche, je te remercie de m'avoir comblée en venant au monde et de faire déborder mon cœur d'amour jour après jour. Je ne remercie pas non plus le petit symbiote qui me pompe toute mon énergie depuis ces trois derniers mois car cette contribution n'est pas très efficace dans cette dernière ligne droite. Mais je te suis reconnaissante d'être là et de me faire envisager un avenir avec encore plus d'amour et de bonheur. Dans ce cocon familial si hostile au repos, un seul être m'apporte un soutien quotidien illimité : Maxence, le seul à qui j'ai donné les clefs de toutes les couches de ma personnalité... et tu es toujours là ! Merci d'être mon ami, mon adversaire, mon amour, ma famille.

Enfin, je me dois de remercier mes plus fidèles compagnes : mes chaussures à talon, qui m'ont littéralement soutenue tous les jours de la semaine, été comme hiver ces cinq années passées au laboratoire. Vous qui m'avez empêché de m'égarer sur la route du laisser-aller et permis de garder le cap de la féminité : merci !

RESUME

L'hémophilie A est une maladie hémorragique rare liée au chromosome X qui se traduit par un défaut qualitatif ou quantitatif de facteur VIII (FVIII) pro-coagulant. Ces déficits en FVIII sont associés à une forte morbidité comprenant des hémorragies parfois spontanées, des arthropathies et un risque de mortalité. Le traitement privilégié des accidents hémorragiques chez les patients hémophiles A est l'administration de FVIII exogène, ce qui représente un coût de plus de 30 000 euros/patient/an dans les pays européens. Cependant, 30% des patients développent une réponse anticorps alloimmune contre le FVIII thérapeutique qui inhibe son activité pro-coagulante. L'apparition d'anticorps inhibiteurs anti-FVIII plonge les patients dans une impasse thérapeutique majeure, affecte de façon drastique leur qualité de vie et augmente dangereusement la morbidité et la mortalité de la maladie.

L'endocytose du FVIII par les cellules dendritiques (DC) et sa présentation aux lymphocytes T (LT) ont été documentées. Cependant, la nature des signaux de danger responsables de la maturation des DC, maturation indispensable à l'activation des LT naïfs et à l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII, est inconnue. Au cours de mon travail de thèse, j'ai cherché à identifier l'origine de ces signaux de danger. Dans ce contexte, j'ai envisagé trois possibilités:

- 1) une origine liée à la structure intrinsèque du FVIII. J'ai ainsi cherché à déterminer si le FVIII pouvait directement activer les CPA par l'intermédiaire du *toll-like receptor 2* (TLR2)
- 2) une origine liée au contexte inflammatoire avant l'administration de FVIII, dans un organisme dont la cascade de la coagulation est interrompue. Ainsi ai-je cherché à savoir si un autre acteur de la coagulation pouvait démontrer un état de sur-activation compensatoire, en particulier les plaquettes, créant ainsi un contexte pro-inflammatoire propice au développement de la réponse immunitaire anti-FVIII
- 3) enfin, une origine liée au contexte inflammatoire généré par l'injection de FVIII exogène. En effet, la réintroduction soudaine de FVIII dans un organisme dont la coagulation a été initiée puis mise en attente provoque une explosion de la génération de thrombine, principal activateur des plaquettes. Dans mes travaux, j'ai cherché à déterminer si les plaquettes jouaient un rôle dans le développement de la réponse anti-FVIII par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires en réponse à une activation par la thrombine.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de démontrer que le FVIII n'était pas capable d'induire la maturation de macrophages murins ou d'activer directement le TLR2. J'ai également écarté l'hypothèse d'un état d'activation compensatoire des plaquettes dans un organisme privé de FVIII. En revanche, mes travaux ont mis en évidence un rôle des plaquettes dans l'initiation de la réponse immunitaire contre le FVIII thérapeutique dans le modèle murin d'hémophilie A. J'ai également apporté des éléments suggérant que l'implication des plaquettes passe par l'intermédiaire de la thrombine générée lors de l'administration du FVIII, thrombine qui active les plaquettes après stimulation des PAR, conduisant à la sécrétion de nombreuses molécules pro-inflammatoires. L'identification des médiateurs de l'inflammation issus de l'activation des plaquettes devrait ouvrir des perspectives thérapeutiques intéressantes dans le contrôle de l'inflammation au moment de l'administration de FVIII, dans le but de réduire son immunogénicité.

LISTE DES PUBLICATIONS

Ce travail de thèse repose sur les publications suivantes :

Article 1 : **Teyssandier M**, André S, Gupta N, Dasgupta S, Bayry J, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Therapeutic factor VIII does not trigger TLR1.2 and TLR2.6 *in vitro*. Haemophilia (en révision).

Article 2 : **Teyssandier M**, Delignat S, Rayes J Bryckaert M, Jandrot-Perrus M, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Activation state of platelet in experimental severe hemophilia A. Haematologica. 2012.

Article 3 : **Teyssandier M**, , Delignat S, Rayes J, Peyron I, Bayry J, Klein C, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Adjuvant role of platelets in the immunogenicity of therapeutic FVIII in hemophilic mice. Blood (soumis).

TABLE DES MATIERES

I- INTRODUCTION	10
I-A. L'HEMOPHILIE A	10
I-A.1. Présentation	10
I-A.2. Historique	10
I-A.3. Génétique de l'hémophilie A	12
I-A.3.1. Le gène codant le FVIII.....	12
I-A.3.2. Mutations sur le gène F8.....	12
I-A.4. La protéine FVIII	13
I-A.4.1. Structure du FVIII.....	13
I-A.4.2. Le FVIII dans l'hémostase.....	15
I-A.4.2.1. L'hémostase	15
I-A.4.2.2. Rôle du FVIII.....	16
I-A.5. Modèles expérimentaux d'hémophilie A congénitale	17
I-A.5.1. La souris invalidée pour le FVIII	18
I-A.5.2. Caractérisation des souris agouti déficientes en FVIII	18
I-B. TRAITEMENTS ET COMPLICATIONS	20
I-B.1. Traitement des hémorragies	20
I-B.1.1. Nature et administration du traitement de prédilection.....	20
I-B.1.2. Les FVIII thérapeutiques.....	20
I-B.1.3. Autres traitements.....	21
I-B.2. Complications du traitement par le FVIII thérapeutique	21
I-B.2.1. Réponse immunitaire contre le FVIII thérapeutique	21
I-B.2.2. Caractéristiques et mode d'action des anticorps anti-FVIII	22
I-B.2.3. Souris hémophiles : injection de FVIII et complications.....	23
I-B.3. Les facteurs de risque associés au développement des inhibiteurs du FVIII.....	23
I-B.3.1. Les facteurs génétiques.....	24
I-B.3.2. Les facteurs environnementaux	25
I-C. REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-FACTEUR VIII : UN SCENARIO CLASSIQUE	28
I-C.1. Les acteurs : cellules présentatrices de l'antigène et facteur VIII	28
I-C.1.1. Le facteur VIII et sa perception par le système immunitaire	28
I-C.1.2. Les cellules présentatrices de l'antigène	29
I-C.1.2.1. Les lymphocytes B	29
I-C.1.2.2. Les macrophages.....	29
I-C.1.2.3. Les cellules dendritiques	30
I-C.2. Le décor : sites d'interaction potentiels	30
I-C.2.1. La rate.....	31
I-C.2.2. Le site de saignement.....	32
I-C.3. Acte I : la rencontre.....	32
I-C.3.1. Les mécanismes d'internalisation.....	33
I-C.3.2. Les récepteurs d'endocytose du facteur VIII.....	33
I-C.4. Acte II : le dialogue CPA-lymphocytes T	34
I-C.4.1. Les lymphocytes T dans la réponse immunitaire anti-facteur VIII	34
I-C.4.2. Activation des lymphocytes T : signal 1.....	35
I-C.4.3. Activation des lymphocytes T : signal 2.....	36
I-C.4.4. Activation des lymphocytes T : signal 3.....	36
I-C.5. Le dénouement : activation des lymphocytes B et production d'anticorps	37
I-C.5.1. Activation des lymphocytes B	38
I-C.5.2. Lymphocytes B mémoires et réponse secondaire.....	39
I-D. LES SIGNAUX DE DANGER	40
I-D.1. Origines	40
I-D.1.1. La théorie du « soi / non-soi ».....	40
I-D.1.2. La théorie du « non-soi infectieux »	41
I-D.1.3. La théorie du danger	42
I-D.2. Caractéristiques et mode d'action du signal de danger	43

I-D.2.1.	<i>Les messagers</i>	43
I-D.2.1.1.	Les molécules exogènes	43
I-D.2.1.2.	Les molécules endogènes	43
I-D.2.2.	<i>Les récepteurs</i>	44
I-D.2.2.1.	Principaux récepteurs concernés	44
I-D.2.2.2.	Zoom sur les TLR	45
I-D.3.	Signal de danger et réponse anti-FVIII	46
I-D.3.1.	<i>Rôle des signaux de danger dans la réponse anti-FVIII</i>	46
I-D.3.2.	<i>Sources potentielles des signaux de danger responsables de l'initiation de la réponse anti-FVIII</i>	48
I-D.3.2.1.	Le produit thérapeutique	48
I-D.3.2.2.	L'environnement thérapeutique	49
I-E.	PLAQUETTES ET IMMUNOGENICITE	50
I-E.1.	Physiologie des plaquettes.....	50
I-E.1.1.	<i>Caractéristiques</i>	50
I-E.1.2.	<i>Rôle des plaquettes dans l'hémostase</i>	52
I-E.1.2.1.	Amplification : recrutement et activation précoce des plaquettes	52
I-E.1.2.2.	Amplification : agrégation secondaire des plaquettes	53
I-E.2.	Les plaquettes dans la réponse immunitaire	54
I-E.2.1.	<i>Les plaquettes : un autre leucocyte ?</i>	54
I-E.2.2.	<i>Interactions entre plaquettes et pathogènes</i>	56
I-E.3.	Les plaquettes dans l'hémophilie A	57
I-F.	OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE	60
I-F.1.	Signaux de danger liés à l'environnement avant injection de FVIII	60
I-F.2.	Signaux de danger liés à l'environnement généré par l'administration de FVIII.....	60
I-F.3.	Signaux de danger liés à la molécule du FVIII	60
II-	RESULTATS	62
II-A.	LE FVIII THERAPEUTIQUE N'ACTIVE PAS TLR1.2 ET TLR2.6 IN VITRO	62
II-B.	ETAT D'ACTIVATION DES PLAQUETTES DANS UN MODELE EXPERIMENTAL D'HEMOPHILIE A	79
II-C.	ROLE ADJUVANT DES PLAQUETTES DANS L'IMMUNOGENICITE DU FVIII THERAPEUTIQUE CHEZ LES SOURIS HEMOPHILES A	83
III-	DISCUSSION	115
III-A.	IMMUNOGENICITE INTRINSEQUE DU FVIII	115
III-B.	IMMUNOGENICITE DU FVIII LIE AU CONTEXTE INFLAMMATOIRE CREE PAR L'ABSENCE DE FVIII	121
III-C.	IMMUNOGENICITE LIEE AU CONTEXTE INFLAMMATOIRE CREE PAR L'INJECTION DE FVIII	126
IV-	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	135
V-	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	138
VI-	ANNEXES	149

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Forme circulante du FVIII.....	14
Figure 2. Activation du FVIII par la thrombine.....	16
Figure 3. Cascade de la coagulation.....	17
Figure 4. Architecture de la rate.....	31
Figure 5. Endocytose du FVIII et présentation des peptides dérivés par le CMH II.....	35
Figure 6. Dialogue cellule présentatrice de l'antigène-lymphocyte T CD4⁺	37
Figure 7. Activation des lymphocytes B.....	38
Figure 8. Granules de sécrétion des plaquettes.....	51
Figure 9. Immunogénicité des protéines de fusion.....	117
Figure 10. Conséquence présumées de l'inhibition sélective des PAR.....	129
Figure 11. Résumé des hypothèses suggérées par les résultats présentés.....	134

ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique	IL : Interleukine
ARNm: Acide ribonucléique messenger	LB : Lymphocyte B
ASGPR : Asialo glycoprotein receptor	LDL: low density lipoprotein
BCR : B-cell receptor	LRP : Low density lipoprotein receptor
BHK : Baby hamster kidney	LT : Lymphocyte T
BM-DC : Cellules dendritiques dérivées de moëlle osseuse	MMR: mannose macrophage receptor
CHO : Chinese hamster ovarian	MO-DC : Cellules dendritiques dérivées de monocytes
CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II	NOD : Nucleotide oligomerization domain
CPA : Cellules présentatrice de l'antigène	PAMP : pathogen-associated molecular pattern
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen – 4	PAR : protéase activated receptor
DAMP : damage-associated molecular pattern	pdFVIII : Facteur VIII dérivé de plasma
DC : Cellules Dendritiques	PRR : pathogen recognition receptor
F8 : gène codant pour le Facteur VIII	PUPS : Previously untreated patient
FT : Facteur tissulaire	rFVIII : Facteur VIII recombinant
FVIII : Facteur VIII	SIGLEC : Sialoadhesin
HLA : human leucocyte antigen	TLR : toll-like receptor
HO-1 : hème oxygénase 1	TNF-α : tumor necrosis factor- α
Ig : immunoglobuline	vWF : facteur Von Willebra

I- INTRODUCTION

I-A. L'hémophilie A

I-A.1. Présentation

L'hémophilie A est le plus fréquent des troubles hémorragiques graves avec une incidence de 1/5000 naissances masculines [1]. C'est une maladie à transmission récessive liée au chromosome X, caractérisée par un défaut qualitatif et/ou quantitatif en facteur VIII (FVIII) pro-coagulant [2]. Dans les formes les plus sévères de la pathologie, les niveaux anormaux de FVIII sont associés à des hémorragies spontanées en particulier au niveau des articulations et des tissus mous. Ces saignements chroniques conduisent au développement d'arthropathies fortement invalidantes et à une morbidité élevée. Le plus défavorable des scénarios reste cependant l'hémorragie intracérébrale, qui touche 3 à 10 % des patients [3] et engage le pronostic vital. En fonction de l'activité résiduelle du FVIII mesurée dans le plasma des patients, on classifie la sévérité de la pathologie : l'hémophilie A est ainsi considérée comme mineure si, en comparaison avec les mesures réalisées sur du plasma sain, l'activité résiduelle du FVIII est comprise entre 5 et 35 % de la valeur normale, comme modérée si la valeur est comprise entre 1 et 5 % et comme sévère pour les patients avec une activité résiduelle inférieure à 1 % [1]. La moitié des hémophiles A présente la forme légère de la maladie, 10 % la forme modérée et 40 % des patients souffrent d'hémophilie sévère [4].

I-A.2. Historique

C'est dans le Talmud de Babylone, un recueil de discussions rabbiniques du II^e siècle, que l'on trouve la première trace écrite de la pathologie [5]. Dans cet ouvrage, il est rapporté que plusieurs sages dispensent de circoncision les petits garçons dont au moins deux frères aînés sont décédés d'hémorragie après circoncision, expliquant que certaines familles ont le sang très fluide alors que d'autres ont le sang fermement retenu.

Il faut attendre 1803 pour avoir une première description scientifique la pathologie dans une publication de l'américain John Otto [6]. Dans cette étude, il suggère une transmission héréditaire de la maladie par les femmes en observant que seuls les hommes développent l'affection mais que les femmes bien qu'exemptes de symptômes, peuvent transmettre la maladie à leurs fils. Pour ce faire, il établit la filiation de plusieurs hommes apparentés souffrant de troubles hémorragiques, avec une femme vivant dans le New Hampshire 80 ans plus tôt.

Cette mystérieuse pathologie obtient une identité en 1828 lorsque Friedrich Hopff, un étudiant de l'Université de Zurich, emploie pour la première fois le mot « haemorrhaphilia » pour la décrire dans son manuscrit de thèse [7]. Ce terme sera ensuite raccourci en « hémophilie » issue du grec *haïma* (sang), et *philia* (affection). Selon Hopff, l'hémophilie ne touchait que des hommes délicats, minces, aux cheveux blond-roux, aux yeux bleus, anxieux et timides.

A cette époque, on ne dispose d'aucun traitement efficace. Otto préconise pour sa part l'utilisation du sulfate de soude. En 1855, l'allemand Ludwig Grandidier, qui publie la première revue d'un grand nombre de cas (420 hémophiles), conseille quant à lui, le jus de citron, l'opium, le chlorure de fer ou l'acétate de plomb. Pourtant en 1840, un médecin britannique du nom de Samuel Lane parvenait à traiter par transfusion sanguine un enfant de 12 ans qui saignait depuis 6 jours suite à une opération des yeux.

La cause de ces hémorragies incontrôlées sera mise à jour en 1937 lorsque Patek et Taylor deux médecins de Harvard identifient chez les individus sains, la présence d'un facteur plasmatique capable de corriger les troubles de la coagulation des hémophiles. Ils baptisent ce composé « globuline anti-hémophilique », qu'une nouvelle nomenclature renommera par la suite facteur VIII, l'hémophilie A est ainsi caractérisée.

L'ère thérapeutique moderne de l'hémophilie débute en 1964, lorsque la chercheuse américaine Judith Pool découvre la possibilité de traiter les patients hémophiles avec un cryoprécipité plasmatique [8].

I-A.3. Génétique de l'hémophilie A

I-A.3.1. Le gène codant le FVIII

Le gène codant pour le FVIII (gène *F8*) a été cloné entre 1982 et 1984 par l'équipe de Gitschier à Genentech [9]. Il est localisé sur l'extrémité distale du bras long du chromosome X (q28) et s'étend sur 186 kpb, ce qui représente près de 0,1 % de la totalité du chromosome. L'information codante est répartie sur 26 exons dont la transcription et l'épissage donnent naissance à un messager de 9 kpb soit 5 % du gène initial. Les 95 % de séquences restantes correspondent aux introns qui, même s'ils ne codent pas pour la protéine, peuvent être porteurs d'une mutation responsable de la déficience en FVIII.

I-A.3.2. Mutations sur le gène F8

L'hétérogénéité phénotypique de l'hémophilie A est le reflet de la grande variété d'anomalies génétiques présentes sur le gène *F8* des patients, comme en témoigne la base de données HAMSTeR (the Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource site ; <http://hadb.org.uk/>), chargée de répertorier ces mutations. Notons également l'existence de rares cas d'hémophilie A où la mutation responsable de la maladie n'est pas localisée sur le gène *F8* mais touche des protéines impliquées dans la production/sécrétion du FVIII [10, 11].

La majorité des cas d'hémophilie A (environ 90 %) a pour origine une mutation ponctuelle dans le gène *F8*, c'est-à-dire la substitution d'un seul nucléotide [12]. Cela inclut les mutations faux-sens, où la substitution conduit au remplacement d'un acide-aminé par un autre, les mutations non-sens, lorsqu'un codon stop est intégré dans la séquence ADN de

façon prématurée, et les mutations d'épissage, quand l'ajout ou la suppression d'un site d'épissage conduit à la formation d'un ARNm mature différent et à une protéine aberrante.

Les petites délétions/insertions et les grandes délétions (> 50 pb) sont retrouvées chez 5 à 10 % de la population hémophile A. Ces mutations entraînent bien souvent un décalage du cadre de lecture de l'ADN, ce qui modifie considérablement la protéine et conduit généralement à une hémophilie sévère [13].

Les duplications et les inversions sont rares, excepté dans le cas de l'intron 22 qui est inversé chez 45 à 50 % des patients atteints de la forme sévère de la maladie [14]. L'inversion de l'intron 22 est classée dans les mutations « nulles » (i.e. qui éliminent complètement la fonction d'un gène) car elle est, en principe, associée à l'absence totale de sécrétion de FVIII, expliquant le phénotype sévère des patients.

En revanche, chez certains patients, la molécule de FVIII est bien sécrétée mais dysfonctionnelle. C'est ainsi que 5 % des hémophiles A ne présentent pas d'activité résiduelle de FVIII détectable dans le plasma mais possèdent un niveau normal de FVIII circulant. Ces patients sont appelés *cross-reactive-material* (CRM)-positifs [15].

I-A.4. La protéine FVIII

I-A.4.1. Structure du FVIII

Le FVIII est majoritairement synthétisé dans le foie cependant, le type cellulaire responsable de sa production reste controversé [16]. La structure primaire de la molécule que l'on définit à partir de son ADNc révèle une protéine multi-domaines de 2352 acides aminés, qui au cours de sa traduction, est transloquée dans le réticulum endoplasmique où elle subit un clivage du peptide signal, réduisant la séquence à 2332 acides aminés, ainsi qu'un repliement tridimensionnel organisé par des protéines chaperonnes. Le passage du FVIII dans le

compartiment intermédiaire ERGIC, puis l'appareil de Golgi entraîne différentes modifications telles que des glycosylations ainsi qu'un deuxième clivage protéolytique qui conduit à la sécrétion d'une protéine atteignant une masse moléculaire de 280 kDa [1, 17]. Dans la circulation, le FVIII se présente donc sous la forme d'un hétérodimère composé d'une chaîne lourde comprenant les domaines A1, A2 et B, et d'une chaîne légère formée par les domaines A3, C1 et C2 [18], reliées par des ions calciques. Trois régions acides entourent le triple domaine A : a1, a2 et a3 (Figure 1). La région a3, en association avec le domaine C2, permet la liaison du FVIII avec le facteur von Willebrand (vWF), une molécule chaperonne qui stabilise le FVIII, le protège d'une dégradation prématurée et permet son acheminement vers le site de saignement [19]. Il semblerait que le FVIII s'associe au vWF au niveau des granules de Weibel-Palade des cellules endothéliales, probablement au cours de la maturation dans le Golgi, mais cela reste à confirmer [20].

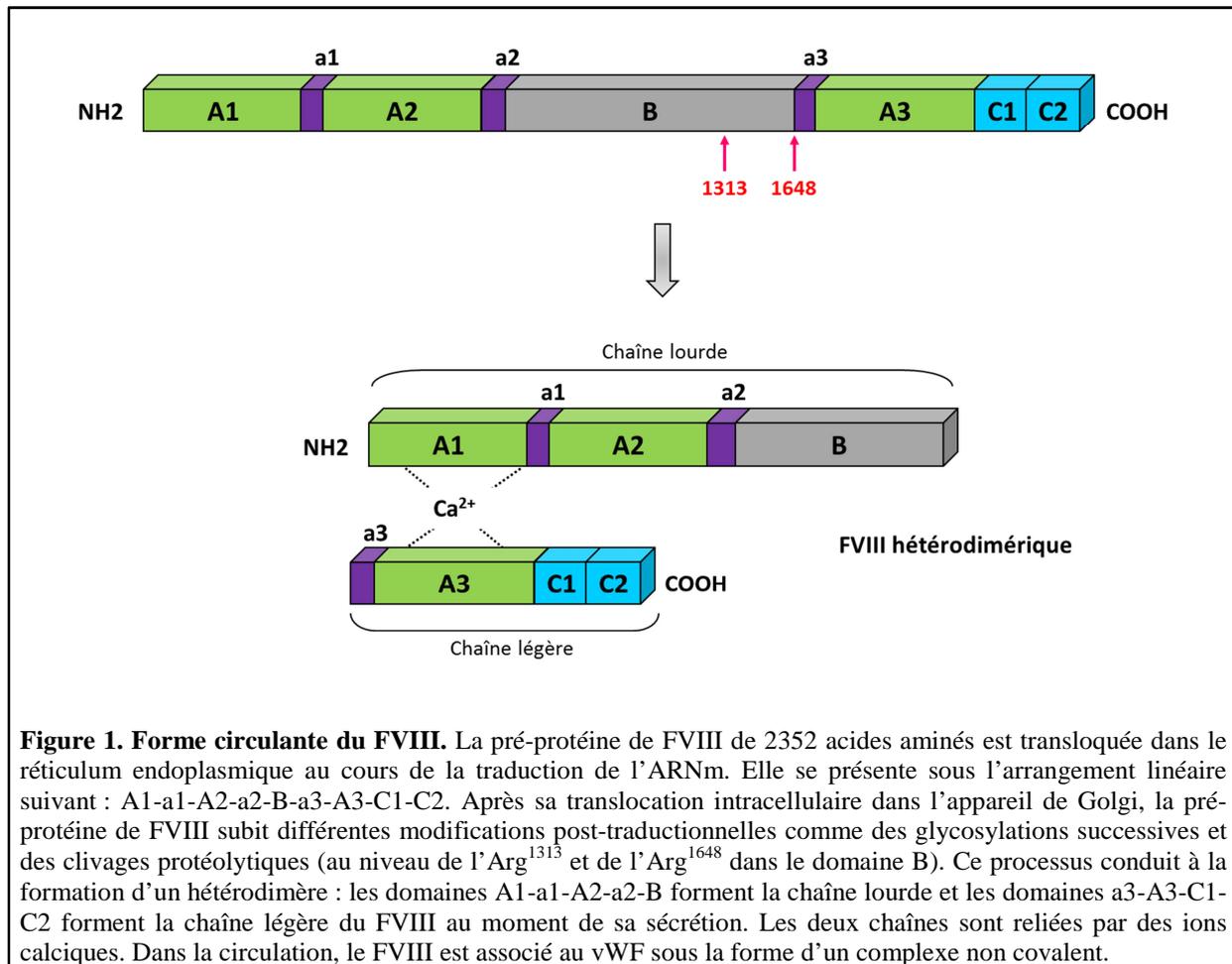


Figure 1. Forme circulante du FVIII. La pré-protéine de FVIII de 2352 acides aminés est transloquée dans le réticulum endoplasmique au cours de la traduction de l'ARNm. Elle se présente sous l'arrangement linéaire suivant : A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. Après sa translocation intracellulaire dans l'appareil de Golgi, la pré-protéine de FVIII subit différentes modifications post-traductionnelles comme des glycosylations successives et des clivages protéolytiques (au niveau de l'Arg¹³¹³ et de l'Arg¹⁶⁴⁸ dans le domaine B). Ce processus conduit à la formation d'un hétérodimère : les domaines A1-a1-A2-a2-B forment la chaîne lourde et les domaines a3-A3-C1-C2 forment la chaîne légère du FVIII au moment de sa sécrétion. Les deux chaînes sont reliées par des ions calciques. Dans la circulation, le FVIII est associé au vWF sous la forme d'un complexe non covalent.

I-A.4.2. Le FVIII dans l'hémostase

Toute altération de l'intégrité de la couche endothéliale vasculaire met à nu des structures sous-endothéliales telles que le collagène et le facteur tissulaire qui, en contact direct avec le sang, induisent les phénomènes de l'hémostase primaire et de la coagulation à l'origine d'un thrombus.

I-A.4.2.1. L'hémostase

Au cours de l'hémostase, une vasoconstriction réflexe est induite, provoquant une augmentation des forces de cisaillement. En fonction de leur intensité, les forces de cisaillement peuvent favoriser l'interaction des plaquettes avec le vWF sécrété par les cellules endothéliales, par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, ce qui ralentit les plaquettes et conduit à leur pré-activation. D'autre part, les plaquettes sont capables de se lier au collagène exposé au moyen de deux autres récepteurs [21]. Ces interactions ont pour conséquences l'immobilisation et la forte activation des plaquettes : elles exposent leurs phospholipides et sécrètent des inducteurs secondaires capables d'agir sur les plaquettes environnantes, conduisant à leur agrégation et à la formation d'un thrombus encore fragile. De façon simultanée, l'exposition du facteur tissulaire déclenche les voies extrinsèque et intrinsèque de la coagulation. Le FVIII est traditionnellement décrit comme appartenant à la voie intrinsèque, mais ces deux voies sont étroitement liées et leur indépendance est remise en question [22]. Quel que soit le chemin, il y a formation précoce de thrombine capable d'activer le FVIII. Cette activation entraîne une boucle d'auto-amplification conduisant à l'explosion de la production de thrombine puis à la génération de fibrine qui consolide le caillot plaquettaire.

I-A.4.2.2. Rôle du FVIII

De façon plus détaillée, le FVIII s'accumule sur le site de saignement par l'intermédiaire du vWF, sa molécule chaperonne. La thrombine active alors le FVIII par clivages protéolytiques au niveau de la chaîne lourde (résidus Arg³⁷² et Arg⁷⁴⁰) et de la chaîne légère (résidu Arg¹⁶⁸⁹), cette dernière coupure dissociant le FVIII du vWF (Figure 2). Le FVIII activé (FVIIIa) joue alors le rôle de co-facteur du facteur IXa dans le complexe FVIIIa/IXa/FX, ou complexe « tenase » ancré aux phospholipides membranaires des plaquettes activées ou des cellules endothéliales lésées. Ce complexe génère du facteur Xa qui s'associe au facteur Va et à la prothrombine afin de générer de la thrombine [23] (Figure 3).

Le FVIIIa est inactivé essentiellement par dissociation spontanée de la liaison ionique entre le domaine A2 et le dimère A1/A3-C1-C2, mais aussi après dégradation protéolytique par la protéine C activée et le facteur Xa.

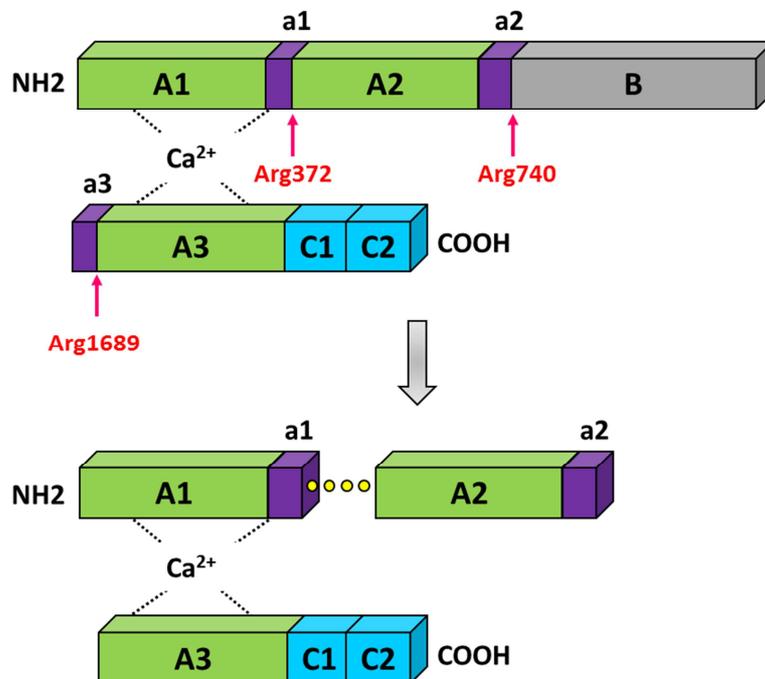


Figure 2. Activation du FVIII par la thrombine. Lors de la coagulation, le FVIII est clivé par la thrombine au niveau de l'Arg³⁷² et de l'Arg⁷⁴⁰ pour la chaîne lourde et au niveau de l'Arg¹⁶⁸⁹ pour la chaîne légère (flèches verticales). Le clivage du FVIII par la thrombine au niveau de ces sites conduit à l'activation du FVIII. Le FVIII activé possède moins d'affinité pour le vWF et le complexe FVIII/vWF se dissocie permettant au FVIII de participer à la cascade de la coagulation.

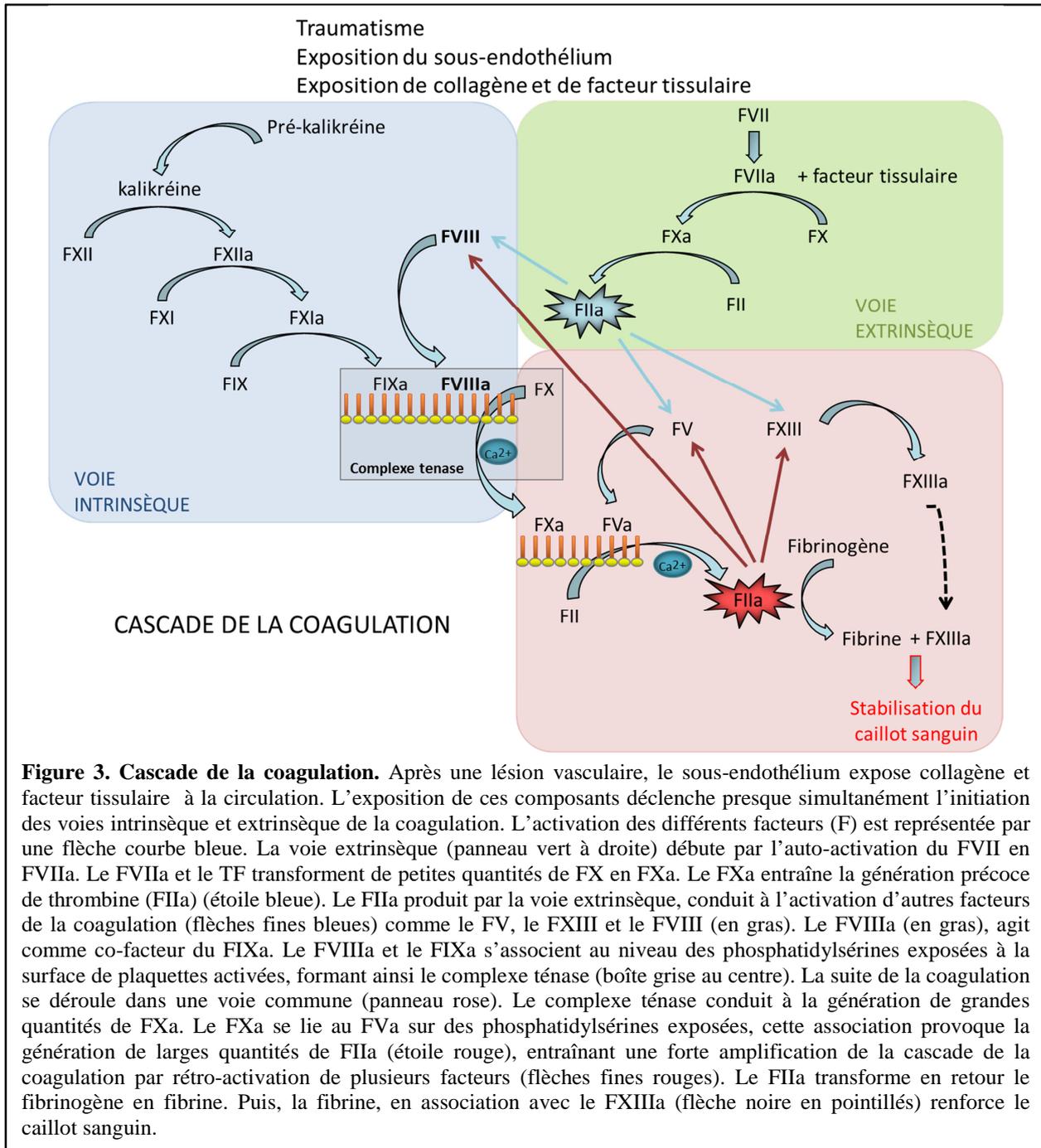


Figure 3. Cascade de la coagulation. Après une lésion vasculaire, le sous-endothélium expose collagène et facteur tissulaire à la circulation. L'exposition de ces composants déclenche presque simultanément l'initiation des voies intrinsèque et extrinsèque de la coagulation. L'activation des différents facteurs (F) est représentée par une flèche courbe bleue. La voie extrinsèque (panneau vert à droite) débute par l'auto-activation du FVII en FVIIa. Le FVIIa et le TF transforment de petites quantités de FX en FXa. Le FXa entraîne la génération précoce de thrombine (FIIa) (étoile bleue). Le FIIa produit par la voie extrinsèque, conduit à l'activation d'autres facteurs de la coagulation (flèches fines bleues) comme le FV, le FXIII et le FVIII (en gras). Le FVIIIa (en gras), agit comme co-facteur du FIXa. Le FVIIIa et le FIXa s'associent au niveau des phosphatidylsérines exposées à la surface de plaquettes activées, formant ainsi le complexe ténase (boîte grise au centre). La suite de la coagulation se déroule dans une voie commune (panneau rose). Le complexe ténase conduit à la génération de grandes quantités de FXa. Le FXa se lie au FVa sur des phosphatidylsérines exposées, cette association provoque la génération de larges quantités de FIIa (étoile rouge), entraînant une forte amplification de la cascade de la coagulation par rétro-activation de plusieurs facteurs (flèches fines rouges). Le FIIa transforme en retour le fibrinogène en fibrine. Puis, la fibrine, en association avec le FXIIIa (flèche noire en pointillés) renforce le caillot sanguin.

I-A.5. Modèles expérimentaux d'hémophilie A congénitale

Une hémophilie A spontanée a pu être observée chez de nombreuses espèces animales telles que le mouton, la vache, le chat ou encore le cheval [24]. Cependant le modèle le mieux étudié reste le chien, décrit pour la première fois par l'équipe de Hutt en 1946 [25]. L'étude du modèle d'hémophilie A canine [26] a mis en évidence la forte ressemblance du mode de

transmission et des manifestations phénotypiques de la maladie entre le chien et l'Homme. Pourtant, le nombre limité d'animaux disponibles, le coût d'entretien et la longueur du temps de génération ont motivé la mise au point de modèles expérimentaux plus pratiques et moins coûteux.

I-A.5.1. La souris invalidée pour le FVIII

Un modèle murin d'hémophilie A transgénique a donc été mis au point en 1995 par l'équipe de Kazazian qui est parvenu à générer deux lignées de souris déficientes en FVIII par interruption de l'exon 16 (E-16) ou de l'exon 17 (E-17) du gène *F8* [27]. Ces souris ont été obtenues par manipulation génétique de cellules ES provenant de souris 129/SV de couleur agouti, et réimplantation dans un blastocyste de souche C57Bl/6. L'inactivation du gène *F8* a été testée chez les souris dont le pelage était au moins à 90% de couleur agouti, présentant ainsi de fortes chances d'avoir hérité du transgène. La lignée agouti déficiente en FVIII est donc une chimère et ne présente pas de fond génétique « pur ». Plus tard, le croisement de ces souris avec des souris sauvages de souches Balb/c et C57Bl/6 a permis l'obtention de souris déficientes en FVIII sous fonds génétiques contrôlés.

I-A.5.2. Caractérisation des souris agouti déficientes en FVIII

Les souris agouti déficientes en FVIII possèdent une activité plasmatique de FVIII inférieure à 1 % de la valeur relevée chez la souris sauvage, présentant ainsi les caractéristiques d'une hémophilie A sévère. Des transcrits partiels d'ARNm du FVIII ont néanmoins été détectés chez ces souris mais aucune trace de chaîne légère ou de chaîne lourde circulantes n'a été mise en évidence [28]. Les tests de coagulation révèlent un temps de saignement prolongé dans les deux modèles en comparaison avec des souris sauvages. Cependant on ne constate que très rarement des saignements spontanés au niveau des

articulations ou des tissus. En conséquence, il n'y a pas de développement d'arthropathies, comme cela est observé chez les patients hémophiles A sévères.

D'autres modèles expérimentaux d'hémophilie A induite par génie génétique sont également disponibles, notamment chez le mouton et le rat [29] mais le modèle murin reste le plus couramment étudié. Au cours de ma thèse, j'ai essentiellement travaillé sur le modèle de souris agouti E-16 déficientes en FVIII.

I-B. Traitements et complications

I-B.1. Traitement des hémorragies

I-B.1.1. Nature et administration du traitement de prédilection

Le traitement privilégié des épisodes hémorragiques chez les patients hémophiles A consiste en l'administration de FVIII thérapeutique par voie intraveineuse. Ce traitement curatif dit « à la demande » a permis, dans les pays industrialisés, de faire passer l'espérance de vie moyenne des malades de 7.8 ans en 1939 à plus de 70 ans en 2001 [30]. En outre, l'utilisation préventive de FVIII exogène est possible en cas de chirurgie mais également en traitement prophylactique. Ce mode d'administration chronique (2 à 3 injections par semaine) a fortement réduit l'apparition d'arthropathies chez les patients hémophiles A [31].

I-B.1.2. Les FVIII thérapeutiques

Lors de ces thérapies, deux catégories de FVIII sont utilisées. Les premiers sont des dérivés plasmatiques (pdFVIII) purifiés à partir d'un mélange de plasma de milliers de donneurs sains, dont la formulation comprend entre-autre de l'albumine, de la fibronectine et du vWF, co-purifiés avec le FVIII plasmatique. Les seconds, issus du génie génétique sont des FVIII recombinants (rFVIII) clonés à partir de la séquence ADN de deux donneurs caucasiens [32]. En fonction de l'industriel qui le commercialise, le rFVIII est produit par des cellules *Chinese Hamster Ovary* (CHO) ou des cellules *Baby Hamster Kidney* (BHK). Ces FVIII thérapeutiques ont une demi-vie moyenne de 12 à 14 heures après administration [33]. Un rFVIII tronqué de son domaine B a également été développé, présentant une efficacité similaire à celle du rFVIII entier dans la correction des saignements, mais avec une demi-vie plus courte [34].

I-B.1.3. Autres traitements

D'autres traitements sont également utilisés pour traiter les hémorragies des patients, en particulier le FVIIa recombinant et un complexe pro-thrombotique, le *factor eight inhibitor bypassing activity* (FEIBA) contenant plusieurs facteurs de la coagulation [35]. Ces deux préparations sont utilisées chez des patients hémophiles A en échec de traitement avec le FVIII exogène.

I-B.2. Complications du traitement par le FVIII thérapeutique

Jusqu'au début des années 1990, la complication la plus critique relative au traitement par le FVIII plasmatique était la transmission d'agents infectieux tels que le VIH ou les hépatites B et C [30]. L'introduction de méthodes d'inactivation virale efficaces pour les FVIII d'origine plasmatique, et la génération de FVIII recombinants ont fait évoluer la morbidité du traitement.

I-B.2.1. Réponse immunitaire contre le FVIII thérapeutique

Actuellement, la plus redoutée des complications consécutive à l'injection de FVIII exogène est l'apparition d'anticorps dirigés contre le FVIII thérapeutique qui neutralisent son activité pro-coagulante. La survenue d'une réponse immunitaire dirigée contre le médicament signe l'échec de la thérapie et expose les patients à un risque accru de mortalité. Cette complication survient en moyenne chez 30 % des patients hémophiles A sévères, et 5 % des patients hémophiles A mineurs/modérés [36]. Outre les thérapies de substitution précédemment citées visant à court-circuiter le besoin en FVIII, un protocole d'induction de tolérance immunitaire (ITI) peut être proposé. Ce protocole, par injections répétées de fortes doses de FVIII thérapeutique cherche à saturer le système immunitaire des patients afin de forcer la tolérance au produit. Ces alternatives sont non seulement contraignantes mais également

extrêmement coûteuses puisque la prise en charge de chaque patient peut atteindre 0,2 millions d'euros par an [37].

I-B.2.2. Caractéristiques et mode d'action des anticorps anti-FVIII

Parmi les anticorps générés lors de la réponse anti-FVIII, tous ne sont pas responsables de la mise en échec du traitement de substitution. En effet, seuls sont impliqués les anticorps capables d'inhiber le rôle pro-coagulant du FVIII thérapeutique, attribut qui leur a valu l'appellation d'anticorps « inhibiteurs ». La réponse inhibitrice des anticorps, évaluée par une variante de la méthode Bethesda (variante Nijmegen) [38] est exprimée en unités Bethesda (UB) par ml de plasma. Cette capacité inhibitrice est définie par l'inverse de la dilution du plasma à laquelle les inhibiteurs qu'il contient sont capables de neutraliser 50 % de l'activité d'un FVIII de plasma normal. Le seuil de positivité a été fixé à 0,6 UB/ml.

Les inhibiteurs du FVIII sont polyclonaux et majoritairement d'isotype IgG avec une chaîne légère lambda ou kappa ; on trouve plus particulièrement la sous-classe IgG₄, souvent accompagnée d'IgG₁ [39]. La prédominance des IgG₄ peut s'expliquer par l'administration répétée du produit thérapeutique : en effet les IgG₄ sont une sous-classe impliquée dans les réactions atopiques déclenchées par une exposition prolongée à certains allergènes comme le pollen, la poussière ou les acariens [40]. Ils témoignent souvent d'une stimulation antigénique chronique.

Le principal mécanisme d'action des inhibiteurs du FVIII est un blocage fonctionnel de la protéine par encombrement stérique. En effet, les principaux épitopes reconnus par les inhibiteurs se situent sur le domaine A2 de la chaîne lourde, empêchant le clivage de la thrombine responsable de l'activation du FVIII et de sa fixation au FIXa [41], et sur les domaines A3 et C2 de la chaîne légère, bloquant l'interaction du FVIII avec le FIXa [42, 43], les phospholipides et/ou le vWF [43, 44]. Certains inhibiteurs se lient également à des épitopes

formés par l'association FVIII/vWF et empêchent la dissociation du complexe suite à l'activation du FVIII par la thrombine [45]. Un autre mécanisme d'inactivation du FVIII a également été décrit : il s'agit de l'hydrolyse du FVIII par des anticorps possédant une activité enzymatique propre [46]. On retrouve ces anticorps « catalytiques » chez 50 % des patients hémophiles A sévères qui ont développé des inhibiteurs [47].

I-B.2.3. Souris hémophiles : injection de FVIII et complications

Chez la plupart des souris E-16 et E-17, l'injection intraveineuse de FVIII humain à dose thérapeutique entraîne l'apparition d'anticorps dirigés contre la protéine thérapeutique dès la deuxième administration [48]. Après la troisième injection, le titre d'anticorps continue d'augmenter et l'intensité de la réponse humorale mesurée par ELISA est fortement corrélée à l'activité inhibitrice des anticorps anti-FVIII déterminée par test Bethesda. Comme chez l'Homme, les épitopes majoritairement reconnus se situent sur les domaines A2 et C2 du FVIII [49]. La dépendance aux lymphocytes T est établie lorsque, trois jours après la première injection de FVIII, on observe une prolifération de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du FVIII. Les nombreuses similitudes entre les patients hémophiles A avec inhibiteurs et la souris déficiente en FVIII font du modèle murin d'hémophilie A sévère un bon modèle d'étude de la réponse immunitaire anti-FVIII.

I-B.3. Les facteurs de risque associés au développement des inhibiteurs du FVIII

Les patients hémophiles A traités avec du FVIII exogène produisent des inhibiteurs au cours des premiers mois de traitement, en moyenne au cours des 10 premiers jours cumulés d'exposition [50]. La raison pour laquelle seule une partie des patients hémophiles A développe une réponse anti-FVIII n'est pas clairement définie. Les différents facteurs de risques identifiés ou proposés jusqu'à présent apportent des éléments de réponse.

I-B.3.1. Les facteurs génétiques

Il est établi que la sévérité de la maladie est un facteur de risque majeur lié à l'apparition des inhibiteurs. Comme précédemment évoqué, les patients hémophiles A sévères ont une plus forte tendance à développer des inhibiteurs que les hémophiles modérés ou mineurs. Cette différence est étroitement liée au type de mutation sur le gène *F8* et à sa conséquence directe : la façon dont le système immunitaire perçoit la protéine mutée. En effet les larges délétions, les mutations non-sens et l'inversion de l'intron 22, qui conduisent à l'expression d'un FVIII fortement tronqué, ou à l'absence totale de FVIII sont les anomalies génétiques les plus fortement associées à l'apparition d'inhibiteurs [50]. Le FVIII thérapeutique apparaît alors à l'organisme de ces patients comme un antigène partiellement voire totalement étranger et le système immunitaire le rejette.

L'haplotype HLA du patient a aussi été proposé comme facteur de risque. Des études cliniques et des études de modélisation suggèrent que certains haplotypes HLA pourraient être associés à un risque élevé d'apparition d'inhibiteurs tandis que d'autres seraient protecteurs [51, 52]. L'implication du système HLA dans la réponse anti-FVIII est confortée par une étude décrivant une mutation dans le domaine C2 du FVIII qui, en diminuant la liaison de certains épitopes au HLA DR, réduit l'immunogénicité du C2 muté chez les souris déficientes en FVIII par rapport au C2 sauvage [53].

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire, dont différents polymorphismes dans le promoteur du gène codant la protéine sont associés à des maladies induites par des auto-anticorps. Dans le cas de l'hémophilie A, Astermark *et al.* montrent que les patients possédant le polymorphisme TNF α -G308A présentent un risque accru de développer des inhibiteurs (72,7 %) [54]. La même année, ce groupe a mis en évidence des mutations dans le promoteur du gène codant l'IL-10, une cytokine immuno-régulatrice, associées à l'apparition

d'inhibiteurs [55]. Plus récemment, une corrélation entre le polymorphisme du promoteur du gène CTLA-4 et le développement des inhibiteurs a aussi été suggérée [56].

L'origine ethnique est également mise en cause avec une prévalence d'inhibiteurs deux fois plus élevée dans la population noire-africaine que dans la population caucasienne [57]. Cependant, cette observation doit être mise en perspective avec le polymorphisme du gène *F8* qui conduit à l'existence de 6 molécules de FVIII dites « sauvages ». En effet, comme évoqué dans le paragraphe *I-B.1.2*, le FVIII thérapeutique recombinant a été cloné à partir de la séquence de deux donneurs caucasiens, ces séquences correspondant à deux polymorphismes différents. Or dans la population caucasienne, seuls ces deux polymorphismes sont présents alors que dans la population noire-africaine, trois polymorphismes supplémentaires ont été mis en évidence [32]. Le FVIII thérapeutique a donc plus de risque d'être perçu comme différent par le système immunitaire des personnes noires-africaines. Dans cet exemple, la génétique n'est probablement pas seule responsable, l'origine du produit thérapeutique jouerait aussi un rôle.

I-B.3.2. Les facteurs environnementaux

La source de FVIII thérapeutique pourrait représenter un facteur de risque important dans la survenue d'inhibiteurs, d'une part en raison de la nature même de la molécule de FVIII, comme cela est suggéré au travers de l'association de ses polymorphismes avec le risque d'alloimmunisation, mais également en raison de la formulation du produit thérapeutique. Depuis plusieurs années, la discussion se focalise en particulier sur la présence ou l'absence de vWF dans les préparations, en fonction de l'origine respectivement plasmatique ou recombinante du FVIII thérapeutique. En effet, une étude récente réalisée chez la souris déficiente en FVIII a montré que le vWF ajouté à une préparation de FVIII recombinant diminue son immunogénicité [58]. Avant cela, différentes études prospectives

avaient été réalisées au début des années 1990 sur des patients non traités auparavant, présentant une activité de FVIII plasmatique < 2 %. Les premiers résultats avaient rapporté une incidence de 24 à 30 % d'inhibiteurs chez les patients traités avec du FVIII recombinant [59-61]. Plus récemment, une étude rétrospective a été réalisée sur des patients traités avec du FVIII plasmatique faisant état d'une incidence d'inhibiteurs de 11 % [62]. Un an plus tard, le même journal publiait une autre étude rétrospective qui ne confirmait pas la différence d'incidence d'inhibiteurs entre patients traités par FVIII plasmatiques et recombinants [63]. Ces études comportent naturellement certains biais comme le nombre limité de patients, l'hétérogénéité de l'échantillon en terme de facteur de risque ou encore la grande diversité des FVIII thérapeutiques utilisés dans les études ; tout cela rend difficile la mise en évidence d'une association entre le type de produit thérapeutique et le développement d'inhibiteurs.

D'autres facteurs de risque environnementaux sont mis en cause comme l'âge au moment de la première injection : avant l'âge de 6 mois, le risque de développer des inhibiteurs est au moins trois fois plus élevé qu'après l'âge de 12 mois [64]. Toutefois, des études récentes contredisent cette observation [65, 66], qui était probablement biaisée par des différences d'intensité de traitement en fonction de l'âge des patients. En effet, l'intensité du traitement a également été proposée comme facteur de risque chez les hémophiles A modérés et sévères. Plusieurs études cliniques ont montré que des traitements intensifs continus d'une durée supérieure à 6 jours étaient associés à une incidence accrue de développement d'inhibiteurs [67, 68].

Par ailleurs, le statut inflammatoire du patient au moment de l'injection du produit thérapeutique pourrait favoriser l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII. En effet, une étude montre que les actes chirurgicaux pratiqués sur les patients hémophiles peuvent être suivis de l'apparition d'inhibiteurs du FVIII [69]. Il est probable que la lésion chirurgicale induise une activation des cellules endothéliales qui sécrètent alors des chimiokines et des

cytokines pro-inflammatoires dans la circulation. Cet environnement pro-inflammatoire pourrait participer au recrutement et à l'activation des effecteurs du système immunitaire.

I-C. Réponse immunitaire anti-facteur VIII : un scénario classique

L'apparition d'inhibiteurs du FVIII résulte de la mise en place d'une réponse immunitaire dirigée contre le FVIII exogène, suite à son administration répétée. Cette réponse immunitaire est considérée comme une réponse allogénique classique, dépendante des lymphocytes T (LT) [70]. Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) reconnaissent puis internalisent l'antigène circulant. Dans les endosomes de ces cellules, l'antigène est clivé en peptides qui sont ensuite associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). A la surface des CPA, le complexe peptide/CMH II est présenté aux LT environnants. Si les CPA reçoivent un signal d'activation, elles sont alors capables d'activer les LT CD4⁺ naïfs spécifiques de l'antigène qui à leur tour vont aider les lymphocytes B à s'activer. Enfin, les cellules B se différencient en plasmocytes capables de sécréter des immunoglobulines et en lymphocytes B mémoires [71].

I-C.1. Les acteurs : cellules présentatrices de l'antigène et facteur VIII

I-C.1.1. Le facteur VIII et sa perception par le système immunitaire

Nous avons précédemment évoqué que le facteur de risque majeur associé au développement d'inhibiteurs est lié à la mutation présente sur le gène *F8* et donc à la façon dont le système immunitaire perçoit le FVIII circulant. En effet, des mécanismes de tolérance sont établis au cours de l'ontogénie du système immunitaire. Ces mécanismes sont maintenus tout au long de la vie afin de prévenir l'apparition de manifestations auto-immunes, tout en garantissant une lutte optimale contre les pathogènes. De toute évidence chez les patients dépourvus de FVIII circulant, les patients CRM-négatifs, les mécanismes de tolérance au FVIII n'ont pas été mis en place et le FVIII thérapeutique est considéré comme étranger, ce qui pourrait expliquer la forte proportion de patients avec inhibiteurs dans cette population. L'absence de tolérance n'est pas si évidente pour les patients CRM-positifs qui développent

des inhibiteurs alors qu'ils produisent un niveau normal de FVIII endogène [72]. Le fait que ce FVIII soit légèrement différent peut éventuellement suffire à justifier son exclusion du système de tolérance. Néanmoins, cette théorie ne permet pas de comprendre la raison pour laquelle les patients CRM-négatifs ne développent pas tous des d'inhibiteurs. L'absence de FVIII endogène ne peut donc à elle seule expliquer l'apparition d'inhibiteurs.

I-C.1.2. Les cellules présentatrices de l'antigène

Qu'un mécanisme de tolérance ait été mis en place ou pas, des cellules sont chargées de patrouiller et de contrôler tout ce qui est à leur portée. Ce sont les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) comme les cellules dendritiques (DC), les macrophages ou les lymphocytes B (LB). Toutes n'assurent pas la même fonction et leur implication dépend notamment du contexte dans lequel l'antigène est rencontré.

I-C.1.2.1. Les lymphocytes B

Par exemple, les LB sont plutôt concernés par les réponses immunitaire secondaires, lorsque l'organisme a déjà été exposé à la molécule. Alors, l'expansion clonale de LB spécifiques de l'antigène permet d'envisager une probabilité de rencontre raisonnable entre la cellule B et l'antigène. Dans le contexte de l'initiation de la réponse anti-FVIII, le LB n'est donc pas un bon candidat au titre de CPA.

I-C.1.2.2. Les macrophages

Les macrophages sont quant à eux souvent décrit comme des cellules phagocytaires efficaces grâce au large spectre de récepteurs d'endocytose présents à leur surface [73]. Dans le sang, ils circulent sous une forme immature en tant que monocytes puis se différencient en macrophages en infiltrant les tissus. De nombreuses sous-populations de macrophages sont également présentes dans la rate.

Parmi elles, les macrophages métallophiliques et les macrophages de la zone marginale, qui semblent impliqués dans la capture du FVIII exogène chez la souris déficiente en FVIII. En effet, notre équipe a mis en évidence dans la rate de ces souris, une co-localisation entre ces deux sous-populations de macrophages et le FVIII thérapeutique injecté [74]. De plus, l'élimination des macrophages spléniques et de la sous-population de DC $CD11c^+/CD8\alpha^-$ par injection de liposomes chargés en clodronate, avant l'administration de FVIII, abroge la réponse humorale anti-FVIII [74].

La capacité des macrophages à activer les LT est cependant moins grande que celle des DC et leur fonction est probablement plus tournée vers la dégradation des antigènes internalisés que vers l'activation du système immunitaire [75].

I-C.1.2.3. Les cellules dendritiques

Les DC sont les seules à être considérées comme CPA professionnelles c'est-à-dire capables de déclencher une réponse immunitaire primaire [76] en activant des LT naïfs. Elles possèdent une forte plasticité : dans la circulation sanguine, elles ont un phénotype immature qui permet l'endocytose abondante des antigènes circulants puis, leur maturation et leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires conduit à une présentation efficace de l'antigène à leur surface et à une activation effective des LT.

Au laboratoire, des travaux ont décrit *in vitro* l'endocytose du FVIII par des DC dérivées de monocytes humains (MO-DC) et sa présentation à des LT $CD4^+$ [77].

I-C.2. Le décor : sites d'interaction potentiels

Les DC sont donc capables de capturer les antigènes circulant dans le sang et de les acheminer vers les organes lymphoïdes secondaires comme la rate, chargée de filtrer le sang.

Les antigènes du sang peuvent aussi directement atteindre la rate sous forme soluble où ils interagissent avec les CPA résidentes.

I-C.2.1. La rate

La rate est organisée en trois régions : la pulpe rouge, la pulpe blanche et entre les deux, la zone marginale. Les antigènes sanguins sont acheminés par l'artère splénique dans la pulpe rouge qui contient beaucoup de macrophages ou dans la zone marginale où résident des LB, différentes sous-populations de macrophages et des DC (Figure 4). L'initiation de la réponse immunitaire nécessite que les antigènes capturés par les CPA rejoignent la pulpe blanche où les LB sont activés de manière LT dépendante [78]. La rate joue un rôle fondamental dans la rencontre entre CPA et antigènes sanguins, à la fois en tant que site de rencontre mais également site d'initiation de la réponse immunitaire [79].

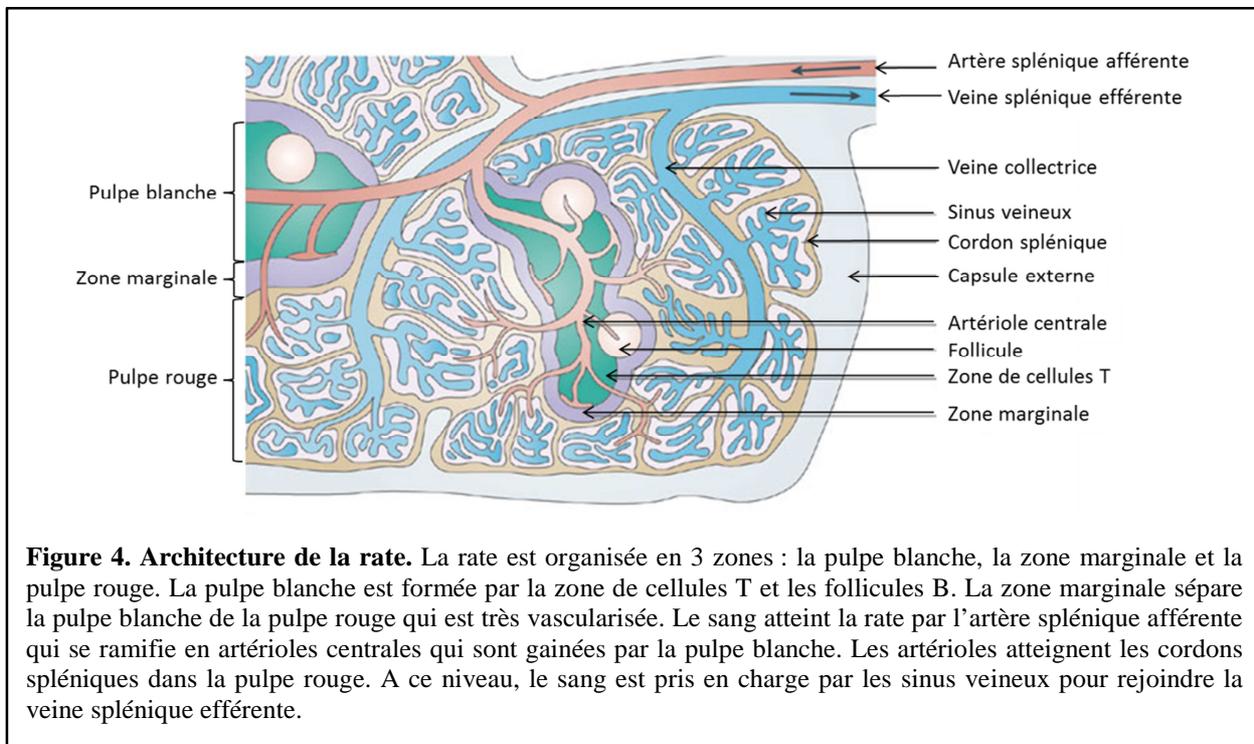


Figure 4. Architecture de la rate. La rate est organisée en 3 zones : la pulpe blanche, la zone marginale et la pulpe rouge. La pulpe blanche est formée par la zone de cellules T et les follicules B. La zone marginale sépare la pulpe blanche de la pulpe rouge qui est très vascularisée. Le sang atteint la rate par l'artère splénique afférente qui se ramifie en artérioles centrales qui sont gainées par la pulpe blanche. Les artérioles atteignent les cordons spléniques dans la pulpe rouge. A ce niveau, le sang est pris en charge par les sinus veineux pour rejoindre la veine splénique efférente.

Cette double fonction semble jouer un rôle important dans le cas de la réponse immunitaire contre le FVIII. En effet, une étude réalisée dans notre laboratoire montre que le FVIII administré à des souris déficientes en FVIII s'accumule dans la rate, et qu'une splénectomie réalisée sur ces mêmes souris avant l'administration de FVIII retarde et réduit l'ampleur de la réponse immunitaire anti-FVIII [74]. La détection d'une réponse immunitaire anti-FVIII, même faible chez les souris splénectomisées semble indiquer que d'autres organes lymphoïdes secondaires peuvent être impliqués dans l'initiation de cette réponse immunitaire, comme les ganglions lymphatiques ou la moelle osseuse.

I-C.2.2. Le site de saignement

Cette observation soulève donc l'hypothèse d'une rencontre précoce entre les CPA et le FVIII exogène c'est-à-dire avant l'arrivée dans les organes lymphoïdes secondaires, hypothèse qui n'exclut pas l'implication probable de la rate dans la réponse anti-FVIII. En effet, le développement d'arthropathies chez les hémophiles témoigne d'une inflammation chronique engendrée par les saignements répétés au niveau des articulations. Ce microenvironnement pro-inflammatoire est capable d'attirer et d'activer les cellules du système immunitaire telles que les CPA. Au demeurant, le site de saignement concentre très probablement une partie du FVIII thérapeutique administré. Il est donc tout à fait rationnel d'envisager une capture du FVIII exogène par les CPA recrutées sur le site de saignement, avant leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires [80].

I-C.3. Acte I : la rencontre

Un antigène capturé par les CPA a deux devenir possibles : son accumulation dans les lysosomes suivie de sa dégradation, autrement dit la voie du catabolisme ou son apprêtement dans les endosomes précoces puis tardifs et sa présentation aux cellules effectrices du système

immunitaire. L'issue dépend du site d'interaction, de la nature des cellules impliquées et du mode d'internalisation de l'antigène.

I-C.3.1. Les mécanismes d'internalisation

Il existe trois mécanismes de capture d'antigène : la macropinocytose, la phagocytose et l'endocytose dépendante de récepteurs. La macropinocytose concerne l'internalisation de fortes quantités d'antigènes solubles de façon non-spécifique par invagination de la membrane. Le fait que le FVIII circule sous forme soluble dans le sang fait de la macropinocytose un mécanisme probable d'internalisation du FVIII par les APC circulantes. La phagocytose quant à elle consiste en la capture de grosses particules solubles comme les virus, les bactéries ou encore les cellules apoptotiques. En ce qui concerne les protéines, l'endocytose passe le plus souvent par l'intermédiaire de récepteurs. L'endocytose dépendante de récepteurs présente au moins deux avantages : elle est efficace d'un point de vue cinétique et elle est spécifique de certains fragments de la protéine, ce qui permet la capture d'antigènes présents à de faibles concentrations dans le milieu environnant [75].

I-C.3.2. Les récepteurs d'endocytose du facteur VIII

La plupart des récepteurs d'endocytose du FVIII décrits jusqu'à présent sont des récepteurs cataboliques. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs aux *low density lipoprotein* (LDL) ou encore à la famille des asialoglycoprotéines (ASGPR) [81, 82]. La seule description d'un récepteur d'internalisation du FVIII capable de conduire à un apprêtement antigénique et à la présentation de peptides dérivés aux LT CD4⁺ est un récepteur de la famille des récepteurs au mannose, le CD206 ou *macrophage mannose receptor* (MMR) [77]. Le CD206 reconnaît les mannoses terminaux des glycanes situés sur les domaines A1 et C1 du FVIII. Cependant, une étude récente remet en cause le rôle du

CD206 en écartant l'implication des récepteurs au mannose dans la capture du FVIII par les APC [83].

I-C.4. Acte II : le dialogue CPA-lymphocytes T

Une réponse immunitaire caractérisée par la production d'anticorps peut se dérouler selon deux scénarii. L'un implique l'activation directe des LB par l'antigène, indépendamment des LT. Ce parcours concerne plutôt les molécules multivalentes ou les protéines agrégées dont les structures répétitives peuvent engager plusieurs récepteurs à la surface des cellules B, et parvenir à activer les cellules si un nombre suffisant de récepteurs est impliqué [84]. La stimulation directe des LB conduit à une réponse humorale forte et rapide, caractérisée par l'absence de maturation d'affinité et de commutation de classe des immunoglobulines [71]. L'autre scénario implique les LT CD4⁺ en tant qu'intermédiaires de l'activation des LB. La réponse LT dépendante aboutit à la production d'anticorps de forte affinité et de LB mémoires [71].

I-C.4.1. Les lymphocytes T dans la réponse immunitaire anti-facteur VIII

De nombreux éléments mis en évidence tant chez les patients hémophilies A que dans le modèle murin, laissent peu de place au doute quant à l'implication des LT CD4⁺ dans la réponse immunitaire anti-FVIII. La présence d'anticorps anti-FVIII d'isotype IgG dans les plasmas humains et murins ainsi que les mutations somatiques mises en évidence sur les gènes V des IgG anti-FVIII humaines font état d'un processus de sélection clonale des LB et d'une maturation d'affinité des immunoglobulines [85], mécanismes exclusivement dépendants des LT. On a également observé chez les patients hémophiles A avec inhibiteurs qui ont de surcroît développé un SIDA, que leur titre d'inhibiteurs diminuait de façon dépendante de la chute des LT CD4⁺ [86, 87]. De plus, la survenue d'inhibiteurs chez les

hémophilie A est associée à une perturbation du répertoire du récepteur des LT spécifiques du FVIII [88], le *T cell receptor* (TCR), ce qui témoigne d'une expansion clonale des LT.

I-C.4.2. Activation des lymphocytes T : signal 1

Après l'internalisation du FVIII par les CPA, la protéolyse de la molécule dans les endosomes permet la formation de peptides qui s'associent à des molécules de CMH II, le complexe moléculaire est ensuite adressé à la membrane des cellules (Figure 5). Dans les organes lymphoïdes secondaires, les CPA « proposent » leurs complexes CMH II/peptides du FVIII aux différents LT naïfs qu'elles rencontrent. Lorsqu'un LT reconnaît de façon spécifique, par l'intermédiaire de son TCR, le complexe peptide/CMH II présenté par la CPA, il reçoit alors un premier signal d'activation. A lui seul, ce signal ne suffit pas à activer pleinement le LT qui, en l'absence d'informations supplémentaires entre en anergie et devient tolérant [89].

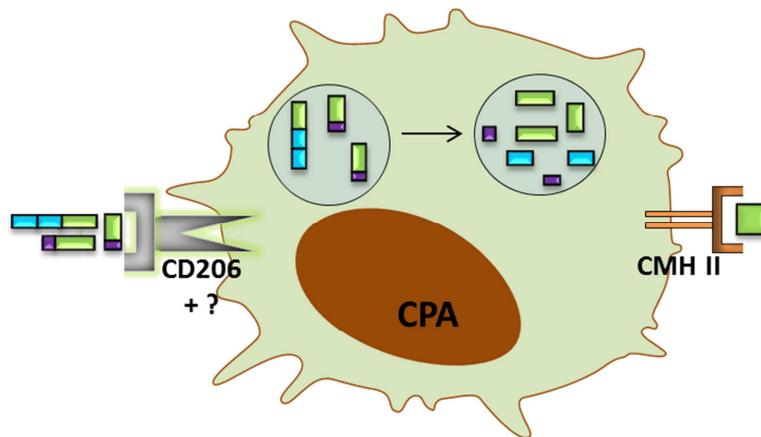


Figure 5. Endocytose du FVIII et présentation des peptides dérivés par le CMH II. Le FVIII est endocyté par un récepteur à la surface des CPA. Le FVIII est internalisé dans des endosomes précoces puis tardifs où des peptides dérivés de la protéine s'associent avec des molécules de CMH II. Les complexes CMH II/peptides sont adressés à la membrane de la CPA.

I-C.4.3. Activation des lymphocytes T : signal 2

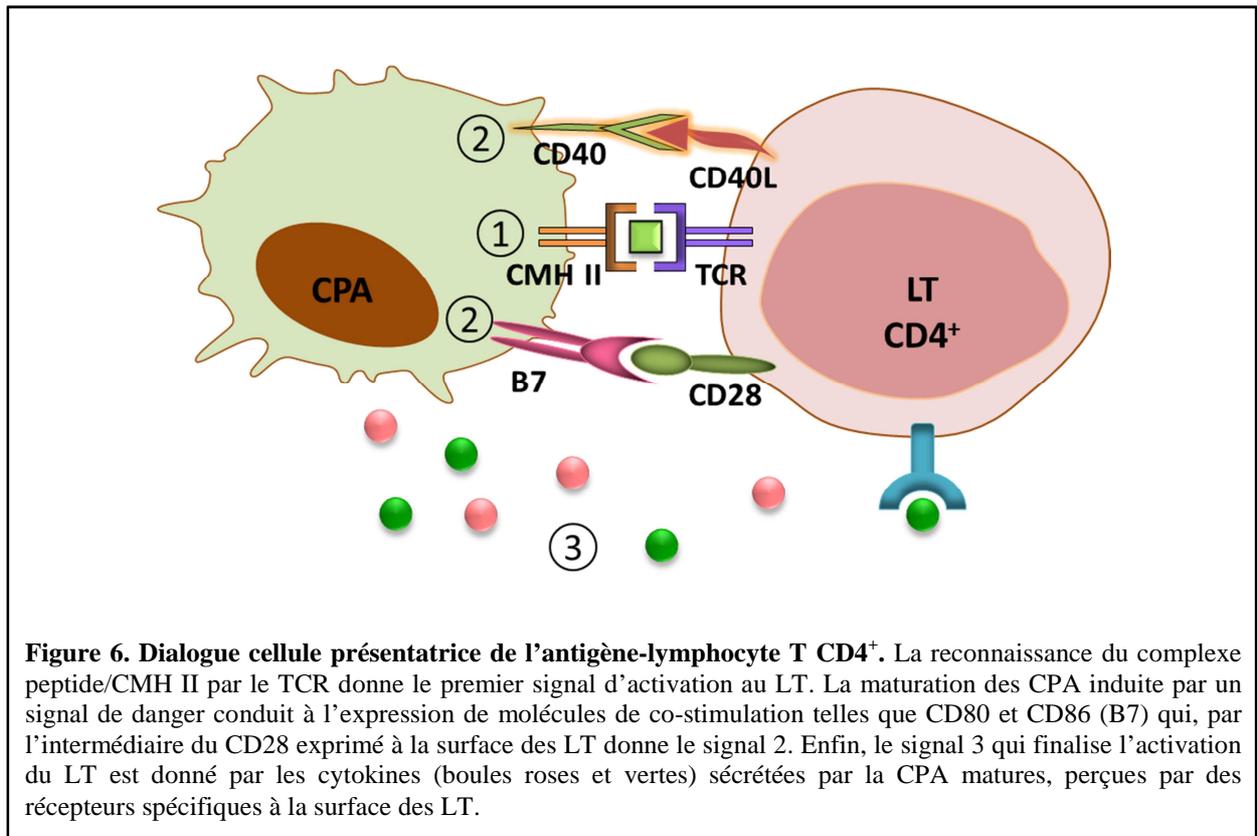
Un second signal est nécessaire pour compléter l'activation du LT : le signal de co-stimulation. Ce signal est fourni par les CPA si et seulement si elles ont-elles-même reçu un « signal de danger » à l'origine de leur maturation, sujet qui sera plus largement développé dans le paragraphe I-D. La maturation des CPA conduit à la surexpression de certaines molécules de surface comme CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) ou CD40. L'interaction des molécules telles que CD80 et CD86 avec CD28 exprimé à la surface des LT donne le signal de co-stimulation aux LT [90]. En retour, le CD154 (CD40L) des LT interagit avec CD40 et stimule les CPA (Figure 6).

L'importance capitale de ce second signal dans l'initiation de la réponse anti-FVIII est illustrée par une étude sur des souris hémophiles présentant également une déficience en B7.1 ou en B7.2. Chez les deux types de souris, l'injection de FVIII thérapeutique est incapable de déclencher la moindre réponse immunitaire, qu'elle soit humorale ou cellulaire [91]. De même la perturbation de l'interaction entre les molécules B7 et CD28 par l'injection d'une protéine de fusion CTLA-4Ig mène à une disparition de la réponse anti-FVIII chez les souris hémophiles injectées [91].

I-C.4.4. Activation des lymphocytes T : signal 3

Pour parfaire l'activation des LT, un troisième signal doit intervenir. En fonction de la nature du stimulus à l'origine de la maturation des CPA, ces dernières vont sécréter différentes cytokines, créant un microenvironnement inflammatoire spécifique. Les cytokines, en se fixant sur leurs récepteurs à la surface des LT finalisent l'activation, et la composition de ce « cocktail cytokinique » est capable de polariser la différenciation des LT en différentes sous-populations de LT « helper » (Th) comme les Th₁, Th₂ et Th₁₇ [90] (Figure 6).

Chez les patients hémophiles A avec inhibiteurs, on trouve les profils Th₁ et Th₂ mais, il semble que les patients avec de faibles titres d'inhibiteurs aient surtout un profil Th₁ et que les patients avec de forts titres d'inhibiteurs, un profil Th₂ [92]. Les Th₁ conduisent préférentiellement à la synthèse d'IgG capables de lier le complément (IgG₁ chez l'Homme et IgG₂ chez la souris) et les Th₂ favorisent plutôt la production d'anticorps qui ne fixent pas le complément (IgE et IgG₄ chez l'Homme, IgG₁ chez la souris).



I-C.5. Le dénouement : activation des lymphocytes B et production d'anticorps

Les LT CD4⁺ activés sur-expriment certaines molécules de surface comme le CD154 (CD40L). Les cellules migrent alors vers les follicules riches en LB et se mettent en quête de LB naïfs spécifiques du FVIII.

I-C.5.1. Activation des lymphocytes B

De leur côté, les LB naïfs sont également entrés en contact avec l'antigène circulant. Leurs immunoglobulines de surface, ou *B cell receptor* (BCR) ont reconnu de façon spécifique l'antigène, conduisant son internalisation dans les endosomes où il a été clivé en peptides qui se sont associés au CMH II avant d'être présentés à la membrane. Un simple contact avec l'antigène n'est cependant pas suffisant pour activer des LB naïfs. Les LT activés entrent alors en scène : leur TCR passent en revue les LB, de nouveau à la recherche d'un complexe peptide/CMH II correspondant. Lorsqu'un LB d'intérêt passe à leur portée, en plus de la liaison spécifique du TCR avec le peptide/CMH II à la surface des LB, les LT engagent une liaison entre leur CD154 ou leur CD28 de surface, respectivement avec le CD40 ou les B7 membranaires des LB, achevant ainsi l'activation des LB [71]. Les LB activés se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en LB mémoires. Les plasmocytes rejoignent la moelle osseuse où ils résident dans des niches spécifiques pour une production optimale d'anticorps (Figure 7). Chez la souris hémophile A, les plasmocytes spécifiques du FVIII persistent en moyenne 22 semaines dans la moelle osseuse, en absence de re-stimulation par le FVIII [93].

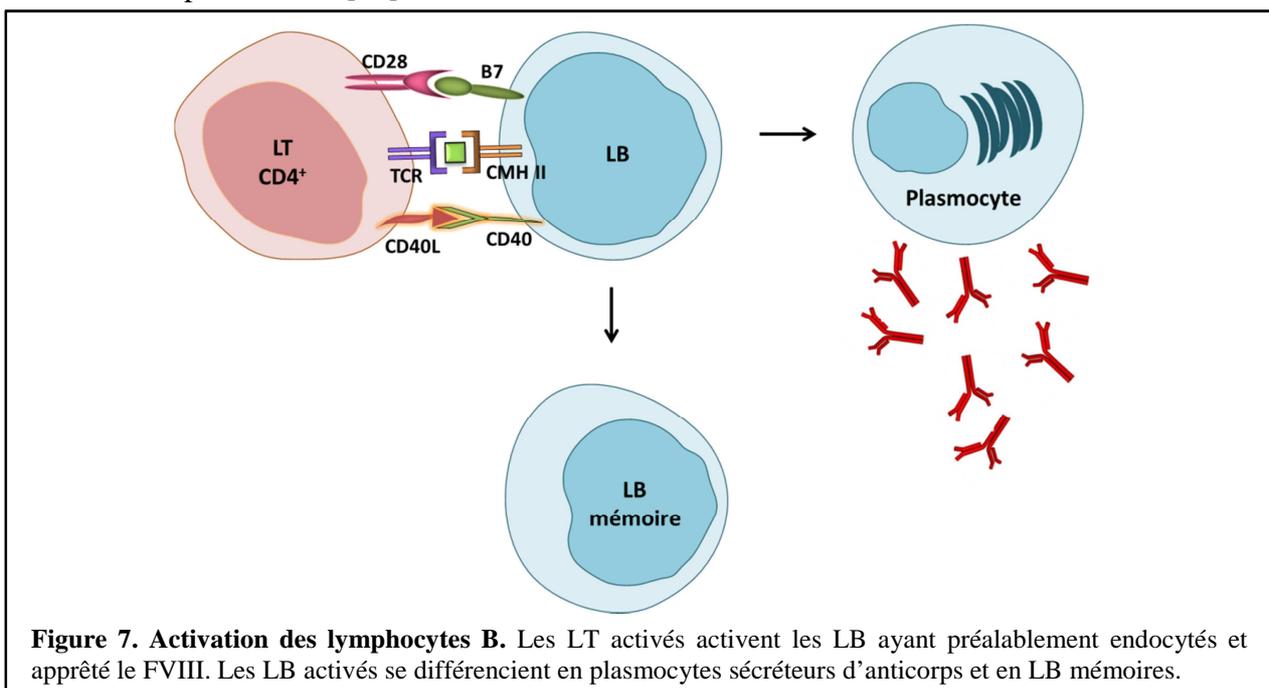


Figure 7. Activation des lymphocytes B. Les LT activés activent les LB ayant préalablement endocytés et apprêtés le FVIII. Les LB activés se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en LB mémoires.

I-C.5.2. Lymphocytes B mémoires et réponse secondaire

Dans le modèle murin, au-delà de 22 semaines, seule la présence de LB mémoires explique la réponse immunitaire forte et rapide observée en cas de re-stimulation avec le FVIII. Le travail de Hausl *et al.* indique que la réponse anti-FVIII secondaire est dépendante de l'antigène et des LT [94]. En effet, la re-stimulation de la réponse anti-FVIII est fortement mise à mal par la perturbation des liaisons B7-CD28 et CD40-CD154, interactions qui, comme précisé dans le paragraphe précédent, interviennent dans le dialogue LT-LB. Nous avons également évoqué précédemment l'implication de ces mêmes interactions dans la stimulation des LT par les CPA : or, cette étude montre que le bouleversement des liaisons B7-CD28 et CD40-CD154 entraîne une diminution de la sécrétion de cytokines par les LT, agissant donc aussi sur l'état d'activation des LT, donc sur les signaux de stimulation perçu par ces derniers.

I-D. Les signaux de danger

Face à une menace potentielle, le système immunitaire doit rapidement prendre une décision cruciale : répondre ou pas. Les immunologistes se sont très rapidement intéressés aux raisons qui motivaient la « prise de décision » de l'organisme, élaborant des théories qui ont évolué au cours du temps, ne parvenant pas toujours à justifier tous les choix de notre système de défense.

I-D.1. Origines

Jusqu'à présent, trois principaux modèles ont servi de support à la réflexion des immunologistes. Ces visions ne sont pas à mettre en opposition, chacune permettant de faire évoluer les limites de la précédente.

I-D.1.1. La théorie du « soi / non-soi »

L'idée que le système immunitaire fonctionne par discrimination de ce qui fait partie de notre organisme (le *soi*) et de ce qui en est extérieur (le *non-soi*) a rapidement émergé au cours de l'histoire de l'immunologie. Les fondements de ce concept sont attribués à Metchnikoff et Ehrlich avec leurs travaux sur les phagocytes et l'immunité cellulaire, travaux récompensés par le prix Nobel de médecine en 1908. Cependant, la formulation moderne de la théorie du soi/non-soi revient à Franck Burnet. Il s'inspire en effet des travaux de Peter Medawar auxquels il participe, sur la tolérance immunitaire (tous deux partageront d'ailleurs le prix Nobel de médecine en 1960). Burnet cherche alors à comprendre comment l'organisme apprend à ne pas éliminer ce qui lui appartient et élabore la théorie de la sélection clonale en 1959, c'est-à-dire l'origine de la tolérance centrale du système immunitaire. L'utilisation du terme « soi » pour décrire l'identité de l'organisme lui est inspirée par l'ouvrage d'H.G. Wells, *The Science of life* [95].

Le modèle original de Burnet apporte trois principaux enseignements :

- chaque lymphocyte exprime plusieurs copies d'un récepteur de surface unique spécifique d'une entité étrangère
- le signal transmit par ce récepteur de surface déclenche la réponse immunitaire
- les lymphocytes auto-réactifs sont éliminés très tôt au cours de la vie

Notons que cette théorie décrit assez clairement le premier signal d'activation reçu par les LT, c'est-à-dire la reconnaissance de l'antigène par un TCR spécifique.

En 1969, la découverte de l'hypermutation des LB, potentiellement génératrice de cellules auto-réactives ébranle quelque peu le modèle de tolérance centrale. En dépit de ce phénomène d'hypermutations, les cas d'auto-immunité restent peu fréquemment observés. Bretscher *et al.* proposent alors un modèle d'activation coopératif entre le LB et une autre cellule (la cellule partenaire se révélera être un LT auxiliaire ou « *helper* ») : l'intervention d'un deuxième partenaire garantit un niveau de sécurité plus élevé pour prévenir les réactions auto-immunes [96]. Puis en 1975 Lafferty *et al.* proposent la participation d'un troisième partenaire cellulaire (les CPA) à l'origine d'un signal d'activation supplémentaire destiné aux LT (le futur signal de co-stimulation ou signal 2) [97].

I-D.1.2. La théorie du « non-soi infectieux »

Le modèle d'initiation de la réponse immunitaire par les CPA, cellules qui ne sont pas spécifiques d'un antigène, s'intègre difficilement dans la théorie de discrimination entre soi et non-soi. En 1989, Janeway propose une solution en mesure de réconcilier les deux modèles. Il suggère que les CPA possèdent leur propre système de discrimination entre soi et non-soi et sont ainsi capables de reconnaître des pathogènes distants d'un point de vue évolutif. Il décrit les CPA comme des cellules quiescentes jusqu'à leur activation par l'intermédiaire d'un groupe de récepteurs, les *pattern recognition receptors* (PRR), qui reconnaissent des

structures moléculaires conservées chez les organismes pathogènes, les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) [98]. Les PAMP apportent un signal de danger aux CPA qui sont alors en mesure de fournir aux LT le signal de co-stimulation (signal 2). Selon Janeway, les PRR permettent aux CPA de faire la différence entre le « non-soi infectieux » et le « soi non-infectieux ».

De nouveau, cette théorie ne permet pas d'expliquer tous les phénomènes immunitaires comme les rejets de greffe, l'auto-immunité ou encore le mode d'action d'adjuvants non bactérien comme l'alun.

I-D.1.3. La théorie du danger

En 1994, Matzinger propose une nouvelle théorie qui s'inspire de la théorie de Janeway [99]. Selon elle, les CPA sont activés par des signaux de danger/d'alarme incarnés par des molécules issues de cellules lésées. Ces structures peuvent être constitutives ou inductibles, intracellulaires ou sécrétées. Le système immunitaire prendrait donc la décision d'engager une réponse contre un antigène (endogène ou exogène) en fonction des signaux d'alerte présents dans son environnement. Huit ans plus tard, Matzinger inclura les PAMP de Janeway dans sa théorie du danger [100], avançant que toutes ces structures dérivent d'une ancienne famille de signaux d'alarme universels du temps de la vie aquatique, constituée de portions hydrophobes exposées : les « hyppo » (*hydrophobic portions*) [101]. Elle regroupe alors les signaux de danger sous le générique de *damage-associated molecular pattern* (DAMP).

Comme les théories précédentes, cette théorie laisse des zones d'ombre, entre autres le non rejet des autogreffes alors que l'acte chirurgical a forcément engendré des dommages cellulaires. Néanmoins, l'intervention d'un signal de danger, quelle que soit sa nature, capable

d'activer les CPA et d'induire leur maturation est aujourd'hui une notion largement admise dans la communauté scientifique.

I-D.2. Caractéristiques et mode d'action du signal de danger

Le signal de danger fait intervenir deux protagonistes : le messenger moléculaire, qu'il soit endogène ou exogène et son récepteur, de la famille des PRR. Naturellement ces deux catégories sont représentées par de nombreux membres.

I-D.2.1. Les messagers

I-D.2.1.1. Les molécules exogènes

Les PAMP correspondent à des composants moléculaires conservés dans les groupes de microorganismes distincts des espèces présentes chez l'hôte. Ces composants sont principalement des carbohydrates et des glycolipides essentiels à la survie des microbes. Ainsi, les molécules constitutives de l'enveloppe cellulaire des pathogènes comme le lipopolysaccharide (LPS) ou le peptidoglycane, peuvent facilement être détectées par les PRR à la surface des cellules de l'hôte. Les composants microbiens intracellulaires comme les acides nucléiques viraux et bactériens, libérés après infection des cellules de l'hôte ou après la phagocytose des pathogènes, sont quant à eux reconnus par des PRR cytosoliques [102]. On peut encore citer le β -glucane des parois fongiques ou le mannose, sucre largement retrouvé à l'extrémité des glycolipides et glycoprotéines microbiens mais rarement exposé sur les glycoprotéines humaines. Il existe également des molécules exogènes non microbiennes capables d'activer les CPA comme l'alun, un adjuvant d'origine minéral [103].

I-D.2.1.2. Les molécules endogènes

Les premiers signaux de danger endogènes identifiés concernent le CD40 ligand (CD40L ou CD154), le TNF- α et l'IL-1 β , capables d'activer directement les DC, seuls ou en

combinaison [104]. La plupart sont des facteurs localisés à l'intérieur des cellules en conditions physiologiques, donc à l'abri de tout contact avec le système immunitaire. En conditions de stress ou de lésion cellulaire, ces molécules sont libérées dans l'environnement extracellulaire par les cellules abîmées et signalent un danger. C'est le cas notamment des cellules nécrotiques qui, lors de la perte d'intégrité de leur membrane plasmique, déchargent dans le milieu extérieur des protéines associées à la chromatine comme la protéine *high-mobility group box 1* (HMGB1) [105], des protéines de choc thermique comme les *heat shock proteins* (HSP) [106], ou encore des produits du métabolisme des purines comme l'ATP [107] ou l'acide urique [108], tous capables d'activer le système immunitaire. On peut également trouver des sources extracellulaires de signaux de danger, en particulier des fragments de matrice extracellulaire endommagée tels que l'acide hyaluronique, le sulfate d'héparane ou le biglycane [109].

En 2007, Oppenheim *et al.* proposent le terme d'*alarmines* pour décrire les molécules endogènes qui agissent comme signal de danger [110].

I-D.2.2. Les récepteurs

I-D.2.2.1. Principaux récepteurs concernés

Il existe cinq principales classes de PRR : les *toll-like receptors* (TLR), des protéines transmembranaires à la surface des cellules ou des endosomes ; les *NOD-like receptors* (NLR), localisés dans le cytoplasme ; les récepteurs aux lectines de type C (CLR), des récepteurs transmembranaires caractérisés par la présence d'un domaine de liaison aux carbohydrates ; les *RIG-I-like receptors* (RLR), des hélicases à ARN qui reconnaissent l'ARN viral et les *AIM2-like receptors*, qui reconnaissent l'ADN microbien intracellulaire [111].

Après reconnaissance d'un ligand, ces récepteurs activent des voies de signalisation comme celle du NF- κ B, des MAP kinases ou des interférons de type I. Ces voies déclenchent la

surexpression de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, capables de recruter et d'activer les cellules du système immunitaire. En dehors de ces cinq familles, Il existe également des PRR atypiques comme le récepteur RAGE qui reconnaît entre autres HMGB1.

De tous ces récepteurs, la famille la plus étudiée et la mieux caractérisée est celle des TLR.

I-D.2.2.2. Zoom sur les TLR

Le rôle essentiel des récepteurs *Toll* dans la lutte contre les infections fongiques est découvert à la fin du XX^e siècle chez la drosophile, une mouche qui ne possède qu'une immunité innée [112]. Un an plus tard, un homologue des récepteurs *Toll* est mis en évidence chez les mammifères, un récepteur baptisé *Toll-like* capable d'induire l'expression de gènes impliqués dans les réponses inflammatoires. Depuis, dix TLR fonctionnels ont été identifiés chez l'Homme et douze chez la souris. Les TLR1 à TLR9 sont conservés dans les deux espèces, le TLR10 murin n'est pas fonctionnel du fait de l'insertion d'un rétrovirus dans sa séquence ADN et le génome humain a perdu les TLR11, TLR12 et TLR13 [113].

Les TLR sont des protéines transmembranaires de type I exprimées à la surface de nombreuses cellules dont les leucocytes. La portion extracellulaire comprend des domaines riches en leucines intervenant dans la reconnaissance de ses ligands par le récepteur, et la partie intracellulaire comporte un domaine *toll-interleukin 1 receptor* (TIR), impliqué dans la transduction du signal. Les TLR sont localisées à la surface des cellules (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) et reconnaissent un très large panel de PAMP et d'alarmines ou dans des vésicules intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) comme le réticulum endoplasmique, les endosomes ou les lysosomes [114] et reconnaissent majoritairement des acides nucléiques.

La voie de signalisation passe nécessairement par le recrutement de protéines adaptatrices (MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM) qui s'ancrent seules ou en combinaison au domaine TIR. Pour la plupart des TLR, s'ensuit une cascade de recrutement de protéines qui aboutit à la

dégradation d'I κ B, une molécule qui séquestre le facteur de transcription NF- κ B dans le cytoplasme. NF- κ B est alors transloqué dans le noyau où il active la transcription de nombreux gènes, en particulier ceux codant pour des cytokines pro-inflammatoires [115].

I-D.3. Signal de danger et réponse anti-FVIII

Le système immunitaire des patients hémophiles A qui ont développé des inhibiteurs du FVIII a tranché en faveur du *oui* à la question « dois-je répondre ? ». En accord avec les théories de Janeway et Matzinger, cela suggère que leur organisme a forcément reçu un signal de danger dans le contexte du traitement.

I-D.3.1. Rôle des signaux de danger dans la réponse anti-FVIII

Tenant compte de cela, Kurnik *et al.* ont lancé une étude pilote sur des patients hémophiles A sévères qui n'ont pas encore été traités (*previously untreated patients*, PUP) par le FVIII thérapeutique. Dès les premiers signes de saignements (en moyenne à 10,7 mois) 26 enfants ont ainsi reçu du FVIII sous forme d'un traitement prophylactique moins chargé en FVIII et administré moins fréquemment que le traitement prophylactique standard (1 x 25 IU/Kg/semaine contre 3 x 40-50 IU/Kg/semaine pour le traitement standard). Au cours des 20 premiers jours d'exposition au FVIII thérapeutique, les injections sont réalisées en évitant rigoureusement la synchronisation avec certaines situations génératrices d'inflammation comme les infections, les actes chirurgicaux ou encore les vaccinations. Les cas d'hémorragies abondantes sont traités très rapidement avec de plus fortes doses de FVIII afin de minimiser le nombre d'injections et de réduire le temps de lésion des tissus. L'incidence de développement d'inhibiteurs est comparée à celle d'un groupe témoin historique constitué de 30 patients ayant reçu le traitement prophylactique standard. Dans ce groupe témoin, 14 patients (48 %) ont développé des inhibiteurs contre un seul patient (3,8 %) dans le groupe d'étude [116]. Ces travaux récents, qui nécessitent d'être confirmés, suggèrent

que l'injection du FVIII exogène dans un contexte qui évite tout signal de danger (saignement, infection, immunisation, ...) diminue le risque d'alloimmunisation.

Au laboratoire, nous avons testé l'effet d'une molécule aux propriétés anti-inflammatoire, l'hème-oxygénase-1 (HO-1) sur l'initiation de la réponse anti-FVIII chez les souris hémophiles A. En effet, l'expression de l'HO-1 est induite par son substrat, l'hème, ainsi que par différents stimuli physiques, chimiques ou biologiques qui ont en commun l'induction d'un stress cellulaire [117, 118]. Les produits du catabolisme de l'hème par HO-1, le monoxyde de carbone (CO) et la biliverdine, possèdent des propriétés anti-inflammatoires efficaces sur différents types cellulaires dont les leucocytes [117, 119]. Des études montrent également qu'un défaut congénital d'HO-1 chez la souris ou chez l'Homme est associé à une inflammation systémique [117, 118]. Nos travaux mettent en évidence que l'induction d'expression de l'HO-1 par administration intraveineuse d'hémine (une forme oxydée de l'hème) avant l'injection de FVIII, se traduit par une réduction drastique des titres d'anticorps anti-FVIII inhibiteurs [120]. Ainsi, le contrôle de l'inflammation au moment de l'administration du traitement pourrait diminuer l'incidence de la réponse contre le FVIII thérapeutique.

Ces deux études mettent en évidence l'importance de l'état inflammatoire de l'organisme et des signaux de danger dans le développement des inhibiteurs du FVIII. La voie est donc ouverte pour l'identification de la nature des signaux de danger impliqués dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-FVIII.

I-D.3.2. Sources potentielles des signaux de danger responsables de l'initiation de la réponse anti-FVIII

I-D.3.2.1. Le produit thérapeutique

La première source à être suspectée en tant que fournisseur du signal de danger aux patients hémophiles A traités fut le produit thérapeutique lui-même. Le mode d'administration par voie intraveineuse étant considéré comme plutôt tolérogène, la composition du produit a donc été passée au crible. Bien évidemment, aucun adjuvant n'est inclus dans la formulation et les récents progrès concernant les méthodes de purification des produits thérapeutiques injectés ont fait pratiquement disparaître les réactions de type choc anaphylactique [71], rendant peu probable la responsabilité de l'excipient dans l'immunogénicité du FVIII. En revanche, les processus industriels d'inactivation virale telle que la pasteurisation sont capables d'induire la formation de néo-antigènes sur le FVIII ou encore de conduire à la formation d'agrégats [112, 114, 121]. Or, les protéines sont connues pour être plus immunogènes lorsqu'elles sont agrégées [122]. C'est ainsi que Purohit *et al.* ont réalisé une étude en induisant artificiellement la formation d'agrégats dans le rFVIII avant de tester son immunogénicité. Il s'est avéré que le FVIII agrégé était moins immunogène [123], excluant ainsi cette hypothèse en tant qu'origine du signal de danger. Enfin, l'immunogénicité intrinsèque du FVIII constitue également un sujet d'étude. Pfistershammer *et al.* ont montré *in vitro* que le FVIII n'était pas capable d'induire directement la maturation de moDC [104], ce qui excluait une reconnaissance directe du FVIII par les PRR présents à la surface des DC. Cependant, une étude récente de Gaitonde *et al.* montre une réduction de la maturation de moDC en présence de FVIII lorsque ce dernier est incubé avec certains composants, suggérant indirectement que le FVIII est capable d'induire un certain niveau de maturation sur les moDC [124]. La capacité du FVIII à activer directement les CPA reste donc controversée.

I-D.3.2.2. L'environnement thérapeutique

Une autre origine possible de signal de danger est l'organisme des patients hémophiles A. En premier lieu, nous avons évoqué précédemment l'état inflammatoire de l'organisme au moment de l'injection. En effet, les saignements répétés représentent une source abondante, chronique et durable de DAMP à l'endroit même où une partie du FVIII thérapeutique se retrouve après injection : le site hémorragique. Ainsi certains acteurs de la cascade de la coagulation peuvent-ils directement activer des PRR comme le fibrinogène, ligand connu de TLR4 [125]. Un autre aspect intéressant dans la production de signaux de danger est la fonction du FVIII injecté, c'est-à-dire les conséquences de son activité. En effet, l'entrée en scène du FVIII dans un scénario hémorragique déclenche soudainement l'activation du FX accumulé jusqu'alors, entraînant une explosion de la génération de thrombine [126] puis la production de fibrine. Ainsi, en inactivant le FVIII par la chaleur avant de l'injecter chez la souris hémophile, l'équipe de David Scott a-t-elle observé une diminution de la réponse immunitaire anti-FVIII, ce qui souligne l'importance de l'activité pro-coagulante de la protéine dans son immunogénicité [127]. Dans cette même étude, l'injection d'un inhibiteur spécifique de la thrombine, l'hirudine, au moment de l'administration de FVIII aux souris, a également conduit à une réduction de la réponse anti-FVIII [127]. Ainsi, l'injection de FVIII sous forme de bolus dans un organisme dont la cascade de coagulation est, sinon totalement interrompue, tout du moins fortement perturbée, provoque la génération soudaine et abondante de certaines molécules capables d'activer le système immunitaire. Le rôle que la thrombine tient dans ce scénario engage probablement la responsabilité d'un autre acteur majeur de la coagulation : le thrombocyte ou plaquette. En effet, la thrombine active les plaquettes qui se mettent à exprimer à leur surface et à sécréter un grand nombre de molécules pro-inflammatoires dont le CD154 qui, comme évoqué précédemment, est capable d'activer les CPA.

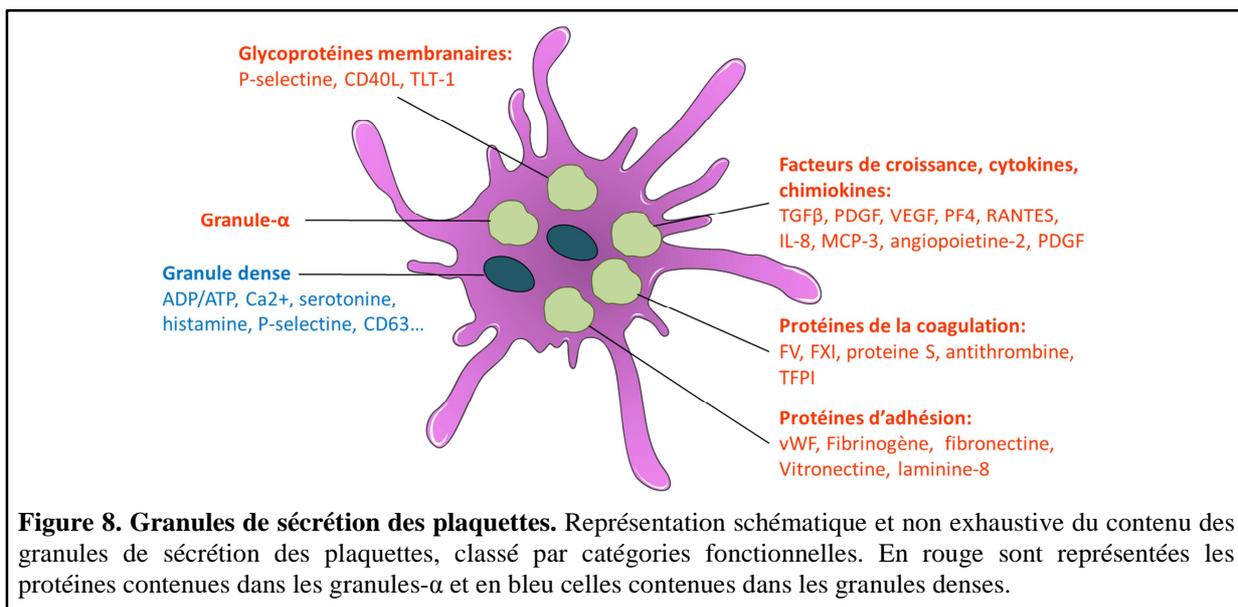
I-E. Plaquettes et immunogénicité

I-E.1. Physiologie des plaquettes

I-E.1.1. Caractéristiques

Les plaquettes sanguines sont des éléments cellulaires anucléés issus de la fragmentation du cytoplasme de leurs progéniteurs hématopoïétiques, les mégacaryocytes. Chaque mégacaryocyte mature produit 1000 à 3000 plaquettes de 2 à 3 μm de diamètre [128]. Lors de la maturation mégacaryocytaire, après une phase dite d'endoreduplication avec duplication de l'ADN sans séparation nucléaire, le cytoplasme forme des extensions : les pro-plaquettes, qui vont finir par se fragmenter en plaquettes dans la circulation [129]. Le site exacte de libération des pro-plaquettes et des plaquettes est encore débattu (capillaires médullaires, ou pulmonaires). Après leur libération, l'architecture interne finale des plaquettes se compose d'un système canaliculaire ouvert (invaginations profondes de la membrane), d'un cytosquelette important, de différents types d'organites (mitochondries, ribosomes...) et de granules (lysosomes et granules de sécrétion) [130]. Parmi les granules de sécrétion on distingue les granules denses qui contiennent entre autres de l'ADP et du calcium, et les granules- α qui contiennent un grand nombre de protéines dont certaines comme le vWF ou le facteur 4 plaquettaire (PF4) sont synthétisées au stade du mégacaryocyte, et d'autres sont d'origine plasmatique comme le fibrinogène, endocyté par l'intermédiaire d'un récepteur ou encore les IgG, internalisées par pinocytose [131]. Plus récemment, les sources de molécules plaquettaires ont été enrichies par une troisième origine : la néosynthèse de protéines. En effet, les plaquettes comprennent des pré-ARNm ainsi que du matériel d'épissage : les spliceosomes, capables de rendre matures les pré-messagers dans certaines conditions [132]. En plus de ce matériel d'épissage, les plaquettes possèdent des structures ribosomiques, les polysomes, qui semblent pouvoir assurer la traduction de certains ARNm [133].

De récentes études ont mis en évidence une hétérogénéité dans le contenu protéique des granules- α [134, 135]. La présence de sous-populations distinctes de granules- α suggère que les plaquettes peuvent mobiliser de façon différentielle ces différentes classes de granules- α , probablement en fonction du contexte environnemental. Ainsi, Italiano *et al* ont-ils découvert que des protéines régulatrices de l'angiogenèse étaient contenues dans des granules- α différents, selon qu'elles soient pro-angiogénique comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), ou anti-angiogénique comme l'endostatine. De plus, la mobilisation sélective de l'une ou l'autre des sous-populations de granules- α semble être fonction de l'agoniste utilisé pour activer les plaquettes [135]. Ces éléments indiquent que l'activation plaquettaire ne conduit pas à une sécrétion homogène d'une multitude de protéines mais à une dégranulation sélective de médiateurs, dépendante du contexte dans lequel les plaquettes sont activées, suggérant une spécialisation de la réponse plaquettaire. En effet, une analyse protéomique a permis d'identifier plus de 300 protéines sécrétées au cours de l'activation des plaquettes [136]. Ces protéines interviennent dans des domaines aussi variés que l'adhésion, la coagulation ou encore l'inflammation (figure 8). Il est donc possible d'envisager que les plaquettes puissent participer à une régulation sélective d'autres grandes fonctions, en particulier la balance pro-inflammatoire/anti-inflammatoire.



Un tiers des plaquettes est localisé dans la rate de manière réversible, le reste se trouve en circulation. Lorsque les plaquettes sont tenues à l'écart de la coagulation, leur durée de vie est de 7 à 12 jours, les plaquettes sénescents étant éliminées principalement par les macrophages du système réticulo-endothélial et par les macrophages de la rate de façon dépendante des IgG [137, 138].

I-E.1.2. Rôle des plaquettes dans l'hémostase

L'activité principale des plaquettes est d'assurer l'hémostase. En cas de lésion vasculaire, elles sont les premiers éléments à intervenir pour stopper l'hémorragie, limiter les pertes sanguines et permettre la cicatrisation. Les plaquettes interviennent surtout dans le système artériel. Lorsqu'elles entrent en contact avec le sous-endothélium lésé, elles suivent une séquence d'évènements liés à différents acteurs moléculaires: elles commencent par adhérer de manière transitoire et répétée, notamment dans les conditions de taux de cisaillement élevés ($>1500 \text{ s}^{-1}$) qui règnent dans les capillaires, les artérioles ou les artères sténosées. Cette étape traduit l'interaction de la GPIb-IX-V au vWF exposé dans la matrice sous-endothéliale, et dont le site d'interaction avec son récepteur est externalisé par les forces de cisaillement. Cette adhésion transitoire ralentit les plaquettes, leur permettant d'interagir avec le collagène par l'intermédiaire de la GPVI et de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa) [139], dans les conditions de plus faibles taux de cisaillement (300 s^{-1}). Les plaquettes s'immobilisent, et l'interaction se renforce et se propage aux plaquettes circulantes par plusieurs phénomènes.

I-E.1.2.1. Amplification : recrutement et activation précoce des plaquettes

Le contact prolongé avec le sous-endothélium entraîne une faible activation des plaquettes qui libèrent des molécules dans le milieu extracellulaire, certaines issues des granules et d'autres néo-synthétisées. Ces éléments agissent de façon autocrine sur les plaquettes, en plus des molécules présentes dans l'environnement, permettant le recrutement

des plaquettes circulantes qui viennent amplifier le phénomène. Parmi les molécules libérées se trouvent des agonistes de récepteurs couplés aux protéines G exposés à la surface des plaquettes. C'est le cas du thromboxane A_2 (TxA_2) et de son récepteur TP, de l'ADP et de ses récepteurs P_2Y_1 et P_2Y_{12} ou encore de la thrombine et de ses *protease-activated receptors* (PAR)-1 et PAR-4 [140]. L'engagement de ces récepteurs fait intervenir un second messager intracellulaire, principalement le calcium (Ca^{2+}) et la phospholipase C (PLC) provoquant notamment une dégranulation. Une autre conséquence majeure de cette signalisation est un changement de conformation de l'intégrine la plus abondante à la surface des plaquettes : $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) [21] qui acquiert ainsi sa forme activée. L'intégrine est alors capable d'interagir de manière hautement affine avec ses ligands, notamment le fibrinogène. La signalisation se soldant par l'activation d' $\alpha_{IIb}\beta_3$ est appelée « *inside-out* » car ce signal intracellulaire conduit à une modification du récepteur dans sa partie extracellulaire.

I-E.1.2.2. Amplification : agrégation secondaire des plaquettes

Les $\alpha_{IIb}\beta_3$ activées interagissent avec le fibrinogène, un ligand multimérique, et se rassemblent en groupes de récepteurs (*clusters*) qui, en se liant à d'autres molécules de fibrinogène également liées à d'autres récepteurs $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquettes voisines, forment des « ponts » inter-plaquettaires. D'autres ligands sont également capables d'interagir avec $\alpha_{IIb}\beta_3$ comme le vWF ou la fibronectine, notamment lors de l'adhésion au sous-endothélium. La liaison $\alpha_{IIb}\beta_3$ -ligands entraîne une signalisation dite « *outside-in* » (issue de l'extérieur de la cellule), engageant une cascade de tyrosine kinases aboutissant à une forte dégranulation entraînant une activation et une agrégation secondaire des plaquettes environnantes. Une autre conséquence de l'interaction $\alpha_{IIb}\beta_3$ -ligand immobilisé est un changement morphologique des plaquettes qui s'étalent, forment des extensions membranaires et exposent des phosphatidylsérines à leur surface [141].

I-E.2. Les plaquettes dans la réponse immunitaire

Outre leur fonction hémostatique, les plaquettes suscitent depuis peu un grand intérêt pour leur implication beaucoup plus méconnue dans l'inflammation. Ainsi, le rôle des plaquettes dans l'induction ou l'amplification de l'inflammation a été mis en évidence dans plusieurs pathologies comme l'athérosclérose [142], l'arthrite rhumatoïde [143], les atteintes inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn [144] ou encore le purpura thrombopénique immunologique [145]. Cette capacité à générer de l'inflammation a lentement fait émerger l'idée que les plaquettes pourraient coopérer avec le système immunitaire dans les réponses contre les pathogènes.

I-E.2.1. Les plaquettes : un autre leucocyte ?

Le concept selon lequel les plaquettes contribuent au système de défense anti-infectieux a pour origine certaines observations concernant leur structure et leurs fonctions. En effet, les plaquettes et les phagocytes professionnels tels que les neutrophiles et les monocytes, ont en commun des antigènes de surface comme les récepteurs d'anticorps FcγRII [146] et FcεRI [147], le récepteur de la protéine C réactive [148], le CR3, récepteur aux protéines du complément C3a et C5a [149] ou comme cela a été démontré plus récemment, les récepteurs aux chimiokines CCR1, CCR3, CCR4 et CXCR4 [150]. Les plaquettes sont aussi capables de répondre à certaines cytokines telles que le TNF-α, l'IL-1 ou encore l'IL-6 [151] de façon similaire aux leucocytes. L'hypothèse selon laquelle les lignées plaquettaires et granulocytaires dériveraient d'un ancêtre cellulaire commun a été proposée [152].

En effet, il est intéressant de constater que les plaquettes possèdent des récepteurs constitutifs et inductibles qui leur confèrent une capacité à détecter et à répondre aux signes d'infection. Par exemple, les plaquettes expriment à leur surface plusieurs TLR, en particulier TLR2, TLR4, et TLR9 présents à l'état quiescent et surexprimés sur les plaquettes activées [153].

Shiraki *et al.* ont également montré la présence des TLR1 et TLR6 sur les plaquettes humaines [154]. De plus, le TLR4 plaquettaire semble fonctionnel *in vivo* puisque sa stimulation par le LPS bactérien induit l'expression de TNF- α [155]. Enfin, les plaquettes disposent d'un NF κ B actif, molécule clef de la voie de signalisation de nombreux TLR et qui, chez les plaquettes, participe à la formation et la stabilisation du thrombus [156].

En plus des récepteurs de chimiokines et des TLR, de nombreuses molécules impliquées dans les réponses immunitaires sont sécrétées par les plaquettes, comme le CD154 stocké dans les granules- α et rapidement externalisé à la membrane des plaquettes activées. Dans les minutes voire les heures qui suivent l'activation des plaquettes, un clivage à leur surface génère du CD154 soluble (sCD154) fonctionnel. On estime que 95 % du sCD154 retrouvé dans la circulation sanguine provient des plaquettes [157]. Comme précédemment évoqué, le CD154 joue un rôle dans la maturation des CPA et dans l'activation des LT, mais il peut également activer les cellules endothéliales. Cependant, le médiateur principal de l'activation des cellules endothéliales par les plaquettes est l'interleukine-1 β (IL-1 β), une molécule que les plaquettes sont à même de synthétiser *de novo* [158]. L'activation des cellules endothéliales conduit à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) comme les ions superoxydes (O $_2^-$) [159] qui exercent une activité antimicrobienne directe, et de chimiokines telles que MCP-1, RANTES et PF4 qui attirent les leucocytes [160].

Les plaquettes activées sont donc capables d'attirer les leucocytes et de les activer de façon paracrine mais également par contact directe puisque le CD154 membranaire avec le CD62P (P-sélectine) également exprimé à la surface des plaquettes activées, sont capables de se lier aux neutrophiles et aux monocytes respectivement par l'intermédiaire de CD40 et PSGL-1 [160].

I-E.2.2. Interactions entre plaquettes et pathogènes

En plus de leur coopération avec les cellules du système immunitaire, de nombreuses études montrent que les plaquettes interagissent avec différents types de pathogènes. En outre, certaines complications consécutives à une infection bactérienne sont caractérisées par une fonction plaquettaire anormale, comme l'endocardite infectieuse [161] ou la coagulation intravasculaire disséminée [162]. En effet, les plaquettes ont la capacité d'interagir avec les bactéries, soit directement avec une protéine bactérienne exposée [163], soit indirectement par l'intermédiaire d'une molécule plasmatique qui sert de pont entre la bactérie et un récepteur à la surface des plaquettes [164]. C'est ainsi que des études ont décrit la capacité de différentes bactéries qui se lient aux plaquettes à induire leur agrégation et leur dégranulation. C'est le cas de *Staphylococcus aureus* [164], *Chlamydia pneumoniae* [165], et *Mycobacterium* [166].

Des interactions avec des pathogènes non-bactériens ont également été décrites comme pour le HIV [167], l'influenza [168] ou le virus de la vaccine [169]. Ces infections virales sont fréquemment associées à une thrombocytopénie qui intervient par destruction des mégacaryocytes et/ou des plaquettes infectées, soit par le virus lui-même soit par le système immunitaire [170]. On répertorie aussi des contacts avec des champignons pathogènes comme *Candida albicans* [171] ou *Aspergillus fumigatus* [172] ; le fait qu'un grand nombre de champignons pathogènes pénètre dans le compartiment intravasculaire suggère qu'une interaction avec les plaquettes pourrait influencer leur potentiel pathogène. Enfin, les plaquettes interagissent également avec les parasites comme *Toxoplasma gondii* [173] ou *Plasmodium falciparum* [174], dans un mécanisme de cytotoxicité faisant intervenir les récepteurs aux IgE des plaquettes.

La capacité des plaquettes à se lier aux agents infectieux suggère un rôle dans la protection de l'organisme. D'un autre côté, cette caractéristique pourrait tout aussi contribuer au transport et

à la dissémination de l'infection [175]. Toutefois, le rôle des plaquettes dans les défenses antimicrobiennes est renforcé par deux observations : la première est la capacité des plaquettes à internaliser certains pathogènes viraux et bactériens dans un compartiment cellulaire spécifique [167] et la seconde, mise à jour très récemment par Chapman *et al.*, serait leur aptitude à présenter un antigène dans le contexte du CMH de classe I et à activer directement des LT naïfs [176]. Cette dernière observation mérite d'être confirmée, en particulier par le contrôle de l'absence de contamination par des lymphocytes dans la fenêtre de sélection des plaquettes. Ainsi, les plaquettes semblent être fortement impliquées dans la détection des antigènes sanguins potentiellement dangereux et dans le déclenchement d'une réponse immunitaire appropriée.

I-E.3. Les plaquettes dans l'hémophilie A

Jusqu'à présent, peu d'informations sont disponibles sur le rôle des plaquettes dans l'hémophilie A et les complications liées au traitement par le FVIII exogène. Récemment, deux groupes ont cherché à savoir si les plaquettes des patients hémophiles A étaient fonctionnellement identiques à celles d'individus sains.

Ainsi, van Bladel *et al.* ont-ils émis l'hypothèse que l'état d'activation et la fonctionnalité des plaquettes pouvaient avoir une influence sur la sévérité des saignements observés chez les patients hémophiles A [177]. En analysant le niveau d'expression membranaire de CD62P comme témoin de l'activation des plaquettes, les auteurs ont montré que les hémophiles A sévères présentaient un plus fort pourcentage de plaquettes constitutivement activées en comparaison aux hémophiles A mineurs/modérés et aux contrôles sains. L'examen de la concentration plasmatique de marqueurs solubles de l'activation plaquettaire tels que PF4 ou RANTES a confirmé cette observation. De plus, le niveau d'expression de CD62P s'est avéré proportionnel à la consommation de FVIII par les patients : plus les patients avaient

consommé de FVIII, moins leurs plaquettes étaient activées de façon constitutive, c'est-à-dire que plus l'organisme se rapprochait de la physiologie en recevant du FVIII, plus les plaquettes ressemblaient à celle d'un individu sain. Une étude fonctionnelle a montré que les plaquettes des patients hémophiles A sévères surexprimaient d'avantage de CD62P en réponse à une stimulation par l'ADP que celles d'individus sains.

Ces observations ont conduit les auteurs à conclure que l'absence de FVIII chez les patients hémophiles A entraînait une sur-activation basale des plaquettes circulantes et une hyperensibilité dans leur réponse aux agonistes, dans le but de compenser le déficit de la coagulation créé par l'absence de FVIII.

Cependant, une étude antérieure de Grünawal *et al.* [178], réalisée sur une cohorte de patients hémophiles A et B sévères n'avait pas montré de sur-activation plaquettaire, tant dans l'expression constitutive des marqueurs d'activation membranaires CD62P, CD63, PAC1 et TSP que dans l'expression induite par TRAP 6 (un peptide dérivé de la thrombine) de ces mêmes marqueurs, en comparaison à des contrôles sains. De plus, l'étude de l'agrégation plaquettaire en réponse à différents agonistes comme l'ADP, la ristocétine et l'épinéphrine confirmait cette tendance, à l'exception du collagène, qui induisait une agrégation significativement plus faible chez les patients hémophiles sévères que chez les donneurs sains. Les auteurs ont conclu à une absence d'activation compensatoire des plaquettes chez les patients hémophiles sévères et ont justifié la réponse réduite au collagène par un défaut fonctionnel concomitant de leurs plaquettes, qui pourrait contribuer au phénotype sévère de la maladie.

Ces deux études contradictoires se focalisent essentiellement sur le rôle hémostatique des plaquettes chez les patients hémophiles et posent la question d'une modification du comportement des plaquettes dans des conditions de coagulation durablement altérée.

Connaissant à présent leur capacité pro-inflammatoire dans les réponses immunitaires, l'influence de plaquettes potentiellement perturbées dans la réponse anti-FVIII reste à explorer.

I-F. Objectifs de mon travail de thèse

Au cours de mon travail de thèse, j'ai cherché à identifier l'origine du signal de danger responsable de l'activation de la réponse immunitaire contre le FVIII thérapeutique. Dans ce contexte, j'ai envisagé trois possibilités : une origine liée à la structure intrinsèque du FVIII, une origine liée à l'environnement inflammatoire résultant de l'absence de FVIII, et une origine liée à l'environnement inflammatoire généré par la réintroduction de FVIII.

I-F.1. Signaux de danger liés à l'environnement avant injection de FVIII

L'une de mes hypothèses de travail est que l'absence de FVIII chez les patients hémophiles A ne perturbe pas seulement la coagulation mais altère également, sur le site de saignement, l'activation plaquettaire, créant ainsi un contexte inflammatoire capable de fournir les signaux de maturation responsables de l'activation des cellules effectrices spécifiques du FVIII au moment de son injection dans l'organisme.

I-F.2. Signaux de danger liés à l'environnement généré par l'administration de FVIII

La réintroduction soudaine de FVIII dans un organisme dont la coagulation a été initiée puis mise en attente provoque une explosion de la génération de thrombine. Or, la thrombine est l'activateur le plus efficace des plaquettes qui possèdent un fort potentiel pro-inflammatoire. J'ai donc cherché à mettre en évidence un rôle des plaquettes dans l'initiation de la réponse anti-FVIII.

I-F.3. Signaux de danger liés à la molécule du FVIII

Au travers des travaux de Pfisterhammer *et al.* [104] et de Gaitonde *et al.* [124] nous avons vu que la capacité du FVIII à activer directement les CPA restait controversée. En ligne avec cette question, des travaux préliminaires non publiés réalisés au laboratoire ont montré que l'injection intraveineuse de la chaîne légère du FVIII, qui est dépourvue d'activité

procoagulante, est suffisante pour induire une réponse anti-FVIII chez les souris déficientes en FVIII, suggérant que des structures sur le FVIII sont responsables de sa reconnaissance par le système immunitaire conduisant à l'initiation d'une réponse anti-FVIII. De plus Amith *et al.* ont rapporté que le FVIII activait la voie des TLR à la surface d'une lignée de macrophages et interagissait avec le TLR2 humain [179].

En utilisant une autre méthode, j'ai souhaité réévaluer *in vitro* l'activation directe des macrophages et du TLR2 par le FVIII thérapeutique.

II- RESULTATS

II-A. Le FVIII thérapeutique n'active pas TLR1.2 et TLR2.6 *in vitro*

Environ 30 % des patients hémophiles A développent une réponse immunitaire qui inhibe le FVIII thérapeutique injecté. L'immunogénicité du FVIII exogène est d'autant plus surprenante que la protéine est administrée par voie intraveineuse et en l'absence d'adjuvant. L'apparition de cette réponse alloimmune implique l'endocytose du FVIII par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), et l'activation des CPA par un signal de danger conduisant à un état de maturation qui garantit l'activation des lymphocytes T au moment de la présentation antigénique. La nature du signal de danger responsable de la maturation des CPA est inconnue. J'ai cherché à savoir si le FVIII lui-même avait la capacité d'agir en tant que signal de danger et d'induire la maturation des CPA. Plusieurs études concernant l'immunogénicité intrinsèque du FVIII ont été menées, avec des résultats contradictoires. Alors que Pfistershammer *et al.* avait montré que le FVIII n'induisait pas la maturation de cellules dendritiques dérivées de monocytes humains (MO-DC) [104], Amith avait décrit dans sa thèse que le FVIII thérapeutique conduisait à l'activation d'une enzyme impliquée dans la reconnaissance d'un ligand par les TLR2, 3 et 4 à la surface de macrophages murins, plus spécifiquement le TLR2 comme l'indiquaient ses expériences sur des cellules transfectées avec les différents TLR [179]. De plus, une étude récente montrait que le FVIII couplé à certaines particules induisait une maturation plus faible que le FVIII seul sur des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse murine (BM-DC) [124], suggérant de manière indirecte que le FVIII induisait une maturation des BM-DC. J'ai donc ré-évalué la question en testant *in vitro* la maturation des BMA, une lignée de macrophages murins, ainsi que l'activation de la voie de signalisation du TLR2 par le FVIII sur des cellules transfectées avec les hétérodimères TLR1.2 et TLR2.6, en présence de FVIII. En accord avec l'étude de Pfistershammer, mes résultats ont montré que le FVIII n'était pas capable d'induire la

maturation des macrophages murins. De plus, contrairement aux travaux d'Amith, je n'ai pas mis en évidence l'activation de la voie de signalisation du TLR2 par le FVIII. Mes résultats ne sont pas en faveur d'une immunogénicité intrinsèque du FVIII thérapeutique tel qu'il est injecté chez les patients hémophiles A.

Therapeutic factor VIII does not trigger TLR1.2 and TLR2.6 signaling *in vitro*

Maud Teyssandier^{1,2,3}, Sebastien André^{1,2,3}, Nimesh Gupta^{1,2,3}, Suryasarathi Dasgupta^{1,2,3,4}, Jagadeesh Bayry^{1,2,3,5}, Srinivas V Kaveri^{1,2,3,5}, Sébastien Lacroix-Desmazes^{1,2,3,5}

¹INSERM, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006 France; ²Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006 France; ³Université Paris Descartes, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006 France; ⁴Immunology division of Microbiology and Immunology department, Harvard Medical School, Boston, USA; ⁵International Associated Laboratory, INSERM, France, and ICMR, India.

Address reprint requests to Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMRS 872, Team 16, Centre de recherche des Cordeliers, 15 rue de l’Ecole de Médecine, F-75006 Paris. Tel: +33 1 44 27 82 02. Email: sebastien.lacroix-desmazes@crc.jussieu.fr

Word count in abstract: 227

Word count in text: 1630

Number of figures: 1

Number of tables: 0

Number of supplementary figures: 0

Number of references: 26

Keywords: Factor VIII, FVIII inhibitor, Immunogenicity, hemophilia A, Toll-like receptors

Abstract

Introduction. The administration of therapeutic factor VIII (FVIII) to patients with hemophilia A induces the development of inhibitory anti-FVIII IgG in a substantial number of patients. For an antigen-specific immune response to develop, antigen-presenting cells (APCs) need to mature and procure appropriate co-stimulatory signals to T cells at the time of presentation of the endocytosed antigen. The nature of the danger signals that induce APC maturation, thus initiating the anti-FVIII immune response, are yet ill-characterized.

Aim. Contradictory reports on a direct effect of therapeutic FVIII on APC maturation have been released. Here, we investigated whether FVIII directly triggers toll-like receptor 2 (TLR2) signaling.

Methods. The capacity of human recombinant FVIII to promote the maturation of mouse BMA macrophages was investigated by flow cytometry. In parallel, the triggering of TLR1.2 or TLR2.6-expressing HEK293 cells by FVIII was analyzed following transfection of the cells with a reporter construct for NFκB activity.

Results. In contrast, to zymosan, a known TLR2 agonist, human recombinant FVIII did not induce the maturation of mouse BMA macrophages, as analyzed by the levels of expression of CD80, CD86, CD40 and I-Ab at the cell surface. Furthermore, incubation of FVIII with TLR1.2 or with TLR2.6-expressing cells failed to activate NFκB, while NKκB activity was triggered in the presence of zymosan.

Conclusions. Our results confirm that FVIII alone is not a source of danger signal for APCs.

Keywords: factor VIII, hemophilia A, FVIII inhibitors, antigen-presenting cells, toll-like receptors

Introduction

Replacement therapy with exogenous factor VIII (FVIII) induces an allo-immune response to FVIII in up to 30 % of patients with hemophilia A [1]. The immune response is characterized by the production of inhibitory anti-FVIII antibodies. The immunogenicity of therapeutic FVIII is surprising given the fact that the molecule is administered intravenously, a route not typically considered as immunogenic, in relatively low amounts and obviously in the absence of adjuvant. Importantly, a substantial fraction of patients with severe hemophilia A and with no traces of circulating FVIII antigen never develop inhibitory anti-FVIII antibodies. This suggests that the absence of thymic education of T lymphocytes towards FVIII, and the ensuing absence of establishment of central tolerance to the molecule, is not sufficient to explain the immunogenicity of the drug.

Several non-exclusive explanations for FVIII immunogenicity have been proposed. Risks for inhibitor development have thus been associated with predisposing genetic factors, with the environment or context that prevails at the time of FVIII administration [2]. Besides, by virtue of its pro-coagulant activity, activated FVIII permits a burst in the generation of thrombin, that not only turns fibrinogen into fibrin to consolidate the platelet clot, but also activates proteinase-activated receptors, thus generating activation signals necessary to ignite the anti-FVIII immune response [3]. The latter finding remains however controversial since FVIII variants devoid of pro-coagulant activity were recently shown to present with the same degree of immunogenicity as native FVIII in a mouse model of severe hemophilia A [4], suggesting that part of the immunogenicity of FVIII is intrinsic to its structure and not only to its cofactor activity.

Toll-like receptors (TLR) are key sensors of the innate immune system responsible for recognizing conserved molecular structures, termed pathogen-associated molecular patterns (PAMP), expressed by various pathogens [5]. The engagement of PAMPs with the

corresponding TLRs leads to the initiation of a proinflammatory transduction cascade that culminates in nuclear translocation of NF- κ B transcription factor and upregulation of diverse inflammatory mediators, such as co-stimulatory molecules (CD40, CD80, CD86), cytokines, chemokines, which together, serve essential functions in promoting specific immune responses [6, 7]. So far 10 TLR have been identified in humans. Among them, TLR2 has the unique ability to heterodimerize with TLR 1 and 6 and recognize the most diverse set of PAMPs [8, 9]. TLRs also respond to endogenous host molecules that are released during cell death and injury. The latter include degradation products of the extracellular matrix, heat-shock proteins, high-mobility group box 1 proteins and oxidized lipids.

A recent report suggested that FVIII is able to trigger TLR-2 at the surface of mouse macrophages and transfected HEK293 cells [10]. Because this is in contradiction with earlier reports showing that FVIII does not directly induce the maturation of immature human monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs), we re-evaluated the question.

Material and Methods

Preparation of FVIII

FVIII (Helixate®, CSL-Behring, Paris) was dialyzed against DMEM for 2 hr at 4°C. FVIII:Ag and FVIII:C were quantified using an Asserachrom® kit (Stago, Asnières sur Seine, France) and a chromogenic assay (Siemens, Marburg, Germany), respectively, using human plasma as a standard. All concentrations indicated are based on the FVIII:Ag values.

Activation of BMA macrophages

The BMA macrophage cell line generated from C57Bl/6 mice was a gift of Dr M Szewczuk (Queen's University, Kingston, Ontario, Canada) [11]. BMA cells were grown in DMEM (Gibco®; Life technologies™, Saint-Aubin, France) supplemented with 5% FCS (Biowest) and 5 µg/ml plasmocin (Invivogen). Cells (1.10^5 cells/ml) were incubated in 24-well plates (TPP®, Trasadingen, Switzerland) alone or with 10 µg/ml FVIII during 24 hr. As a positive control, cells were incubated with 66.7 µg/ml zymosan A from *Saccharomyces cerevisia* (Sigma-aldrich; St. Louis, MO), a known TLR2 ligand (Sigma-Aldrich). Cells were harvested with Accutase (Invitrogen) and immunostained with PE-labelled anti-TLR2 (TL2.1, eBioscience; San Diego, CA), FITC-labelled anti-Ly6c (AL-21), PE-labelled anti-CD11b (M1/70), FITC-labelled anti-IA^b (AF6-120.1), PE-labelled anti-CD11c (HL3), FITC-labelled anti-CD86 (GL1), PE-labelled anti-CD80 (16-10A1) or PE-labelled anti-CD40 (3/23 BD P) (all from BD biosciences) antibodies. Stained cells were then analyzed by flow cytometry (LSR II, BD).

Activation of TLR-transfected HEK 293 cells

HEK293 cells transfected with human TLR1.2 (hTLR1.2) and human TLR2.6 (hTLR2.6) were purchased from InvivoGen. HEK293 cells transfected with human TLR3 (hTLR3) were obtained from Prof I Cremer (INSERM UMRS 872, Centre de Recherche des Cordeliers,

Université Pierre et Marie Curie, Paris, France). TLR-transfected HEK293 cells were grown in DMEM (Gibco®) supplemented with 10% FCS and 10 µg/ml blasticidin (Invivogen). hTLR1.2, hTLR2.6 and hTLR3-expressing HEK293 cells ($3 \cdot 10^4$ cells/100 µl) were seeded in flat-bottom 96-well plates 24 hr before transfection. The cells were transiently transfected with the NF-κB-driven secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter construct (pNiFty-SEAP, Invivogen) using Lipofectamine 2000™ (Invitrogen). Twenty-four hours following transfection, cells were stimulated for 24 hr with 66.7 µg/ml zymosan, 10 µg/ml FVIII or left untreated as controls. SEAP activity in the cell supernatants was measured by colorimetric assay using the QUANTI-Blue™ substrate (Invivogen). Optical densities were measured by a microplate reader (GENios, TECAN) at 620 nm.

Results

Incubation of FVIII with BMA macrophages fails to activate the cells

Macrophages express a wide variety of Toll-like receptors [12]. We thus used the BMA mouse macrophage cell line to test the activation of TLR by FVIII. Untreated BMA macrophages expressed low levels of different differentiation (CD11b, CD11c, Ly6C) and maturation (CD80, CD86, CD40 and I-Ab) markers, as well as TLR2 (Figure 1A). Stimulation of the cells with zymosan induced an increase in the expression levels of all the tested markers including TLR2. Conversely, incubation of the macrophages with FVIII was not associated with an increased expression of the differentiation and maturation markers, suggesting the absence of TLR triggering by recombinant FVIII.

FVIII is not a ligand for TLR2

Because BMA cells are of mouse origin, we repeated similar experiments using HEK cells expressing different human TLR molecules. Upon stimulation, TLRs recruit various protein kinases via several adaptor molecules, such as MyD88, leading to the nuclear translocation of NF- κ B, a transcription factor implicated in the activation of numerous genes. To monitor the induction of TLR2 signaling, we transfected hTLR2-expressing HEK293 cells with pNiFty-SEAP, a TLR-signaling reporter plasmid. Binding of NF- κ B to the plasmid promoter leads to the secretion of alkaline phosphatase that can be measured using a colorimetric assay. Human TLR1.2 and TLR2.6-expressing HEK293 cells were incubated with zymosan, FVIII or left untreated as controls. While non-stimulated cells presented with baseline levels of NF- κ B promoter activation, zymosan induced the activation of the NF- κ B promoter in both hTLR1.2 and hTLR2.6-expressing HEK293 cells (Figure 1B). It however failed to activate NF- κ B in control human TLR3-expressing HEK293 cells. FVIII tested at different concentrations systematically failed to trigger TLR 1.2, TLR 2.6, as well as TLR3.

Discussion

For an immune response to develop, antigen-presenting cells (APCs) need to endocytose the antigen and to provide T cells with co-stimulatory signals at the time of antigen presentation. To this end, APCs have to reach a maturation state in response to “danger signals” delivered by the microenvironment. In the case of the anti-FVIII immune response, the nature of the danger signals and of their target receptors remains undefined. Pfistershammer *et al.* previously published that FVIII fails to induce the maturation of human monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) *in vitro*, suggesting that FVIII is not able to directly provide human DCs with danger signals [13]. Conversely, Gaitonde *et al.* recently documented a reduction of the surface expression of CD40 at the surface of dendritic cells derived from the bone marrow of hemophilic mice following incubation with FVIII mixed to phosphatidylinositol, as compared to FVIII alone [14], thus indirectly suggesting that FVIII may impart some maturation to APCs. Besides, a functional interaction between therapeutic FVIII and TLR2 on BMC-2 C57Bl/6 mouse macrophages was recently suggested using an assay for the detection of TLR ligand-induced sialidase activity [15]. In the present study, TLR2-expressing BMA macrophages, which are identical to the BMC-2 cell line, failed to up-regulate maturation markers following incubation with therapeutic FVIII, while zymosan, a known TLR2 ligand, induced maturation. Accordingly, incubation with FVIII of TLR1.2 and TLR2.6-expressing HEK293 cells transfected with a TLR-signaling reporter plasmid did not activate the cells in contrast to zymosan.

Different endocytic receptors have been described that mediate FVIII internalization. These include receptors involved in FVIII catabolism, such as receptors of the low-density lipoprotein receptor family [16, 17], heparan sulphate proteoglycans [18] and the asialoglycoprotein receptor [19]. Siglec-5, a family of receptors that recognize sialic acid structures and are mainly expressed on macrophages [20], has recently been proposed as an

additional catabolic receptor for FVIII [21]. To date, CD206 is the only reported endocytic receptor implicated in FVIII immunogenicity [22-24]. However, to our knowledge, none of the described endocytic receptors able to bind FVIII are endowed with maturation inducing capacity. Of note, all these studies have been performed using DCs as a model of APCs. Yet, we have reported the importance of macrophages in the initiation of the anti-FVIII immune response [25]. Furthermore, amino-acids 2090, 2092 and 2093 in the C1 domain of FVIII have recently been shown to mediate FVIII endocytosis and immunogenicity in a CD206-independent pathway, thus paving the way towards the identification of an additional endocytic receptor for FVIII [26].

Taken together, our results confirm that FVIII immunogenicity is not inherent to a direct triggering of TLRs. It however does not exclude the possibility that FVIII triggers the maturation of innate immune cells once it is in complex to yet unidentified partner molecule(s).

Acknowledgements

This work was supported by INSERM, by CNRS, by UPMC-Paris6, and by the 2008 “Prof. Heimburger award” from CSL-Behring (Marburg, Germany). MT was the recipient of fellowships from Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de la Technologie (MERT, Paris, France) and Fondation pour le Recherche Médicale (FRM, Paris). SD was a recipient of a fellowship from FRM. Helixate® was a gift from CSL-Behring.

Authors contributions

Designed research: MT, SA, SD, JB, SLD

Performed research: MT, SA

Analyzed data: MT, SA, NG, SD, JB, SVK, SLD

Wrote the paper: MT, SA, SLD

Disclosure of conflict of interests

The authors declare no conflict of interest

References

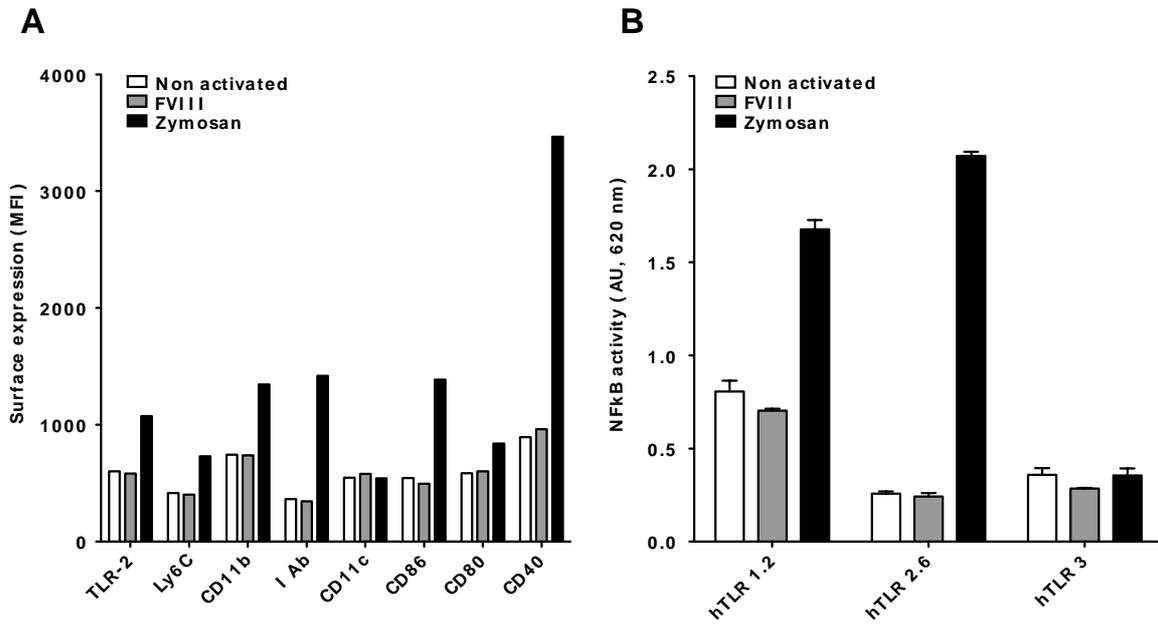
1. Ehrenforth S, Kreuz W, Scharrer I, Linde R, Funk M, Gungor T, *et al.* Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* 1992; **339**: 594-8.
2. Astermark J. Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia. *Haemophilia* 2006; **12 Suppl 3**: 52-60.
3. Skupsky J, Zhang AH, Su Y, Scott DW. A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood* 2009; **114**: 4741-8.
4. Shannon L, Meeks M, Courtney Cox, M.S., John F. Healey, B.S., Ernest T Parker, B.A., Bagirath Gangadharan, MS, Rachel T. Barrow, BS and John (Pete) S. Lollar III, M.D. Factor VIII Structure, Not Activity, Is the Primary Determinant of Immunogenicity in Hemophilia A and Combined Hemophilia A/Von Willebrand Disease Mice. *53rd ASH Annual Meeting and exposition*. San diego, CA, USA, 2011.
5. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011; **34**: 637-50.
6. Medzhitov R, Janeway C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; **8**: 452-6.
7. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 499-511.
8. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 335-76.
9. Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, *et al.* Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 2009; **31**: 873-84.
10. Amith SR. The role of NEU1sialidase in toll-like receptor activation. *Department of Microbiology and Immunology*. Kingston, Ontario, Canada: Queen's University, 2009: 299.

11. Kovacsovics-Bankowski M, Rock KL. Presentation of exogenous antigens by macrophages: analysis of major histocompatibility complex class I and II presentation and regulation by cytokines. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 2421-8.
12. Cole JE, Georgiou E, Monaco C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010; **2010**: 393946.
13. Pfistershammer K, Stockl J, Siekmann J, Turecek PL, Schwarz HP, Reipert BM. Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells. *Thromb Haemost* 2006; **96**: 309-16.
14. Gaitonde P, Peng A, Straubinger RM, Bankert RB, Balu-Iyer SV. Downregulation of CD40 signal and induction of TGF-beta by phosphatidylinositol mediates reduction in immunogenicity against recombinant human Factor VIII. *J Pharm Sci* 2012; **101**: 48-55.
15. Amith SR, Jayanth P, Franchuk S, Siddiqui S, Seyrantepe V, Gee K, *et al.* Dependence of pathogen molecule-induced toll-like receptor activation and cell function on Neu1 sialidase. *Glycoconj J* 2009; **26**: 1197-212.
16. Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem* 1999; **274**: 37685-92.
17. Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BM, Clijsters PP, Meijerman DW, Pannekoek H, *et al.* The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1999; **274**: 23734-9.
18. Sarafanov AG, Ananyeva NM, Shima M, Saenko EL. Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 2001; **276**: 11970-9.

19. Bovenschen N, Rijken DC, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Mertens K. The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 1257-65.
20. Jandus C, Simon HU, von Gunten S. Targeting siglecs--a novel pharmacological strategy for immuno- and glycotherapy. *Biochem Pharmacol* 2011; **82**: 323-32.
21. Pegon JN, Kurdi M, Casari C, Odouard S, Denis CV, Christophe OD, *et al.* Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* 2012.
22. Dasgupta S, Navarrete AM, Bayry J, Delignat S, Wootla B, Andre S, *et al.* A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 8965-70.
23. Dasgupta S, Navarrete AM, Andre S, Wootla B, Delignat S, Repesse Y, *et al.* Factor VIII bypasses CD91/LRP for endocytosis by dendritic cells leading to T-cell activation. *Haematologica* 2008; **93**: 83-9.
24. Repesse Y, Dasgupta S, Navarrete AM, Delignat S, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 1172-3; author reply 4-5.
25. Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, Caligiuri G, Christophe OD, Bayry J, *et al.* Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 1816-23.
26. Herczenik E, van Haren SD, Wroblewska A, Kaijen P, van den Biggelaar M, Meijer AB, *et al.* Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 501-9, 9 e1-5.

Figure legend

Figure 1. FVIII fails to activate TLR2. Panel A. Expression levels of activation markers on BMA macrophages incubated with FVIII. $3 \cdot 10^4$ cells were incubated alone (empty bars), with 10 $\mu\text{g/ml}$ FVIII (grey bars) or with 66.7 $\mu\text{g/ml}$ zymosan (black bars) for 24 hr. The expression of TLR2, Ly6C, CD11b, I Ab, CD11c, CD86, CD80 and CD40 at the surface of the cells was analyzed by flow cytometry and is expressed as mean fluorescent intensities (MFI). Data are representative of two independent experiments. **Panel B. Activation of the NF- κ B promoter in hTLR2-expressing HEK293 cells incubated with FVIII.** Cells were transfected with the NF- κ B reporter pNiFty-SEAP plasmid. After 24 hr, cells were incubated alone (white bars) with 10 $\mu\text{g/ml}$ FVIII (white bars), with 10 $\mu\text{g/ml}$ OVA (blue bars) or with 66.7 $\mu\text{g/ml}$ zymosan (grey bars) for 24 hr. The secretion of SEAP was measured using a colorimetric assay with the QUANTI-Blue™ substrate. SEAP activity was assessed by reading OD at 620 nm.



II-B. Etat d'activation des plaquettes dans un modèle expérimental d'hémophilie A

L'absence de FVIII chez les patients hémophiles A altère de façon importante la coagulation. Une des hypothèses que j'ai cherchée à vérifier est que cette perturbation pourrait également avoir des répercussions sur les partenaires du FVIII dans l'hémostase, qui compenseraient la faible coagulation par une augmentation de leur activité pro-coagulante. En particulier, je me suis intéressée aux plaquettes, partenaires privilégiés du FVIII dans la cascade de la coagulation et dont la sur-activation compensatoire pourrait créer un contexte inflammatoire propice à l'initiation de la réponse immunitaire contre le FVIII exogène. En effet, les plaquettes activées sécrètent des chimiokines et des cytokines capables d'attirer et d'activer les cellules du système immunitaire. De plus, une étude récente conduite par van Bladel *et al.* montre que l'activation des plaquettes est augmentée chez les patients hémophiles A sévères [177]. Cependant les travaux antérieurs de Grünewald *et al.* n'avaient pas montré d'activité compensatoire des plaquettes chez les patients hémophiles sévères [178]. Afin d'aborder la question *in vivo* dans un système qui n'est pas perturbé par des facteurs génétiques ou environnementaux inhérents à toute population humaine, j'ai étudié l'état d'activation et la capacité à être activées des plaquettes de souris sauvages et de souris déficientes en FVIII. Ces deux souches de souris, de fond génétique C57BL/6, ont récemment été croisées au laboratoire afin de nous assurer du minimum de variabilité génétique, à l'exception de la mutation sur le gène responsable de l'hémophilie A. La comparaison des plaquettes purifiées issues des deux souches murines n'a révélé aucune différence significative, tant dans l'état basale d'activation des plaquettes, que dans leur capacité à être activées en réponse au peptide activateur TRAP-4 et à la thrombine. Mes résultats indiquent que l'absence de FVIII chez les souris hémophiles A adultes non manipulées, n'est pas associée à une sur-activation compensatoire des plaquettes. Ces résultats excluent un rôle d'une hyperactivation des plaquettes circulantes dans la formation d'un contexte inflammatoire préalable à l'injection de

FVIII thérapeutique et qui aurait favorisé le développement de la réponse anti-FVIII chez les souris hémophiles A.

Activation state of platelets in experimental severe hemophilia A

Factor VIII (FVIII) is a key protein of the coagulation cascade where it acts as the cofactor of activated factor IX. Upon activation, FVIII dissociates from von Willebrand factor and binds to phospholipids at the surface of activated platelets to form the tenase complex, thus leading to the activation of factor X, to a burst of generation of thrombin and to the formation of fibrin that consolidates the platelet clot.¹ Abnormalities in the gene encoding FVIII lead to hemophilia A (HA), a rare X-linked recessive hemorrhagic disorder that concerns one male in 5000. Depending on the residual activity of FVIII in plasma, HA is classified as severe (<1%), moderate (1-5%) or mild (5-25%).² Although this classification correlates with the bleeding phenotype, about 10% of severe HA patients rarely bleed spontaneously, indicating that FVIII activity is not the only parameter defining the phenotypic severity of the disease.³

In their recent publication,⁴ van Bladel et al. investigated the basal state of activation and responsiveness of circulating platelets under conditions of abnormal hemostasis as a potential parameter influencing the bleeding phenotype of the patients. They found that the state of activation of platelets is up-regulated in patients with severe HA. The percentage of platelets expressing CD62P (P-selectin) at their surface was greater in patients with severe HA (15.9%) as compared to that in patients with mild/moderate HA (8.2%) and in healthy controls (6.4%). An earlier report had, however, failed to find signs of enhanced platelet pre-activation in patients with severe HA.⁵ In order to address the question *in vivo* in a system that is not perturbed by the different genetic or environmental factors that are typical of the human population, we studied the state of activation and responsiveness of platelets from wild-type mice and FVIII-deficient (FVIII⁰) mice, an experimental model of severe hemophilia A. To this end, wild-type and FVIII⁰ mice were crossed on the C57Bl/6 background in our laboratory to ensure the lowest genetic variability with the exception of the HA-causing gene alteration.

Blood was collected on ACD-C buffer (124 mM sodium citrate, 130 mM citric acid, 110 mM dextrose, pH 6.5) from 12-14-week old mice by intra-cardiac puncture. Animals were handled according to local ethical authority recommendations (the Charles Darwin University Animal Ethics Committee, Ce5/2010/045). Platelets were purified in the presence of inhibitors (0.3 U/mL apyrase and 100 nM prostaglandin E1) as described.⁶ Purity of platelets was over 99% as assessed by the expression of CD41 and size estimate (side scatter) by flow cytometry (data not shown). Platelets were then stimulated by the thrombin receptor-activating peptide TRAP-4.⁷ The state of activation of platelets was estimated by the surface expression of CD62P, of aIIb β 3 (GPIIb/IIIa) and by the surface binding of fibrinogen, measured by flow cytometry. Results are expressed as mean fluorescence intensities (MFI \pm SEM) on the total platelet population (Figure 1).

Unstimulated platelets demonstrated low levels of expression of CD62P, aIIb β 3 and of surface-bound fibrinogen, that did not differ between wild-type mice and FVIII⁰ mice (wild-type: 85 \pm 20, 479 \pm 60 and 173 \pm 49 MFI, respectively; FVIII⁰: 71 \pm 9, 519 \pm 74, and 217 \pm 55 MFI

respectively). Interestingly, similar levels of expression of CD62P and aIIb β 3 were measured on platelets in fresh blood (data not shown), suggesting that the purification procedure does not activate the platelets. In the case of wild-type mice, incubation of the platelets with TRAP-4 resulted in a drastic increase in the expression levels of

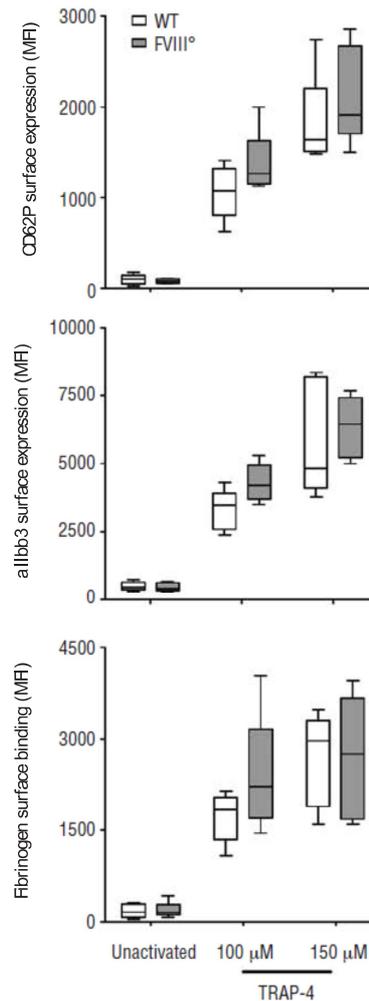


Figure 1. Basal activation status and responsiveness of platelets from FVIII-deficient mice (FVIII⁰) and their wild-type littermates (WT). Platelets were purified from the blood of WT (open bars) and FVIII⁰ mice (full gray bars). Purified platelets were incubated alone or with 100 nM or 150 nM of TRAP-4 in tyrode buffer for 15 min at room temperature. The surface expression of CD62P (upper panel), aIIb β 3 (middle panel) and surface binding of fibrinogen (lower panel) were determined by flow cytometry using a PE-conjugated rat anti-mouse CD62P monoclonal antibody (Wug.E9), a PE-conjugated rat anti-mouse aIIb β 3 monoclonal antibody (JON/A), and oregon-green-labeled fibrinogen, respectively. Results (5-8 mice per group) are expressed as mean fluorescence intensities (MFI) \pm standard error mean (SEM). Differences were compared statistically using the non-parametric Mann-Whitney test.

CD62P, a11bb3 and in surface-bound fibrinogen (916±138, 3282±236, and 1714±182 MFI, respectively; $P < 0.05$ in all cases as compared to unstimulated platelets) indicating that the purified platelets were functional and susceptible to activation. The incubation of platelets from FVIII⁰ mice with TRAP-4 yielded expression levels of CD62P, a11bb3 and levels of surface-bound fibrinogen (1151±186, 4529±851 and 2103±255 MFI, respectively) that were statistically identical to those induced by TRAP-4 on platelets from their wild-type littermates. Similar results were obtained with different concentrations of TRAP-4 (Figure 1) and when thrombin was used instead of TRAP-4 (data not shown).

Taken together, our data indicate that the absence of pro-coagulant FVIII in unmanipulated adult animals is not associated either with alterations in the activation status of circulating platelets or with their ability to be activated. In patients with severe HA, the most significant morbidity is the development of arthropathy in joints that results from recurrent intra-articular hemorrhages. In our laboratory conditions, FVIII⁰ mice do not bleed spontaneously and do not experience premature mortality. Indeed, FVIII⁰ mice do not develop arthropathy unless bleeding is experimentally provoked in the articulations.^{6,9} Whether the state of activation and responsiveness of platelets differs under conditions of chronic hemorrhages in hemophilic mice is still to be investigated.

Maud Teyssandier,^{1,2,3} Sandrine Dèignat,^{1,2,3} Julie Rayes,^{1,2,3} Marijke Bryckaert,⁴ Martine Jandrot-Perrus,⁵ Srinivasa Kaveri,^{1,2,3,6} and Sébastien Lacroix-Desmazes^{1,2,3,6}

¹INSERM, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris; ²Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris; ³Université Paris Descartes, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris; ⁴INSERM U770, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre; ⁵INSERM U698, Hôpital Xavier Bichat, Paris; and ⁶International Associated Laboratory IMPACT, INSERM, France.

Correspondence: Sébastien Lacroix-Desmazes at INSERM UMR 872 Equipe 16, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France. Phone: international +33.1.44278202. Fax: international +33.1.44278194. E-mail: Sebastien.Lacroix-Desmazes@rcjussieu.fr

Key words: hemophilia A, platelet, FVIII-deficient mice

Citation: Teyssandier M, Dèignat S, Rayes J, Bryckaert M, Jandrot-Perrus M, Kaveri SV, and Lacroix-Desmazes S.

Activation state of platelets in experimental severe hemophilia A. *Haematologica* 2012;97(6):000-000. doi:10.3324/haematd.2011.065235

Funding: this work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, and by a grant from CLS-Behring (Marburg, Germany). MT was the recipient of scholarships from Ministère de la Recherche (Paris) and from Fondation de la Recherche Médicale (FRM, Paris).

The information provided by the authors about contributions from persons listed as authors and in acknowledgments is available with the full text of this paper at www.haematologica.org.

Financial and other disclosures provided by the authors using the ICMJE (www.icmje.org) Uniform Format for Disclosure of Competing Interests are also available at www.haematologica.org.

References

1. Lenting PJ van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1998;92(11):3983-96.
2. Biggs R, Macfarlane RG. Haemophilia and related conditions: a survey of 187 cases. *Br J Haematol*. 1958;4(1):1-27.
3. Molho P, Rolland N, Lebrun T, Dirat G, Courpied JP, Crougts T, et al. Epidemiological survey of the orthopaedic status of severe haemophilia A and B patients in France. The French Study Group. secretariat.haemophiles@cch.ap-hop-paris.fr. *Haemophilia*. 2000; 6(1):23-32.
4. van Bladel ER, Roest M, de Groot PG, Schutgens RE. Up-regulation of platelet activation in hemophilia A. *Haematologica*. 2011; 96(6):888-95.
5. Grunewald M, Stegeman A, Grunewald A, Konegen A, Kokschi M, Griesshammer M. Absence of compensatory platelet activation in patients with severe haemophilia, but evidence for a platelet collagen-activation defect. *Platelets*. 2002;13(8):451-8.
6. Jandrot-Perrus M, Lagrue AH, Okuma M, Bon C. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. *J Biol Chem*. 1997;272(43): 27035-41.
7. Adam F, Kauskot A, Nurden P, Sulpice E, Hoylaerts MF, Davis RJ, et al. Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood*. 2010;115(20):4083-92.
8. Hakobyan N, Enockson C, Cole AA, Sumner DR, Valentino LA. Experimental haemophilic arthropathy in a mouse model of a massive haemarthrosis: gross, radiological and histological changes. *Haemophilia*. 2008;14(4):804-9.
9. Valentino LA, Hakobyan N, Kazarian T, Jabbar KJ, Jabbar AA. Experimental haemophilic synovitis: rationale and development of a murine model of human factor VIII deficiency. *Haemophilia*. 2004;10(3):280-7.

II-C. Rôle adjuvant des plaquettes dans l'immunogénicité du FVIII thérapeutique chez les souris hémophiles A

L'injection de FVIII exogène dans un organisme où la coagulation est interrompue déclenche une reprise soudaine de la fonction hémostatique, provoquant une explosion de la génération de thrombine et de FXa. En addition de leur rôle au sein de la cascade de la coagulation, la thrombine et le FXa sont des activateurs des récepteurs activés par les protéases (*protease-activated receptors*, PAR) [180, 181], exprimés à la surface de nombreuses cellules, en particulier des cellules endothéliales et des plaquettes, qui sont des partenaires-clefs de la coagulation. Récemment, Skupsky *et al.* ont montré que la thrombine jouait un rôle dans l'initiation de la réponse anti-FVIII chez les souris hémophiles A [127]. La thrombine est l'activateur le plus efficace des plaquettes, dont l'activation entraîne la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires. De plus, les plaquettes ont été impliquées dans la régulation de processus immunologiques et inflammatoires [182, 183]. L'activation massive des plaquettes, en réponse à la thrombine générée par l'injection de FVIII exogène, pourrait fournir les molécules responsables de l'activation du système immunitaire dans la réponse contre le FVIII thérapeutique. Par ailleurs, les travaux de Verschoor *et al.* avaient montré que les plaquettes peuvent transporter certains pathogènes dans la rate [175], ce qui permet l'initiation d'une réponse immunitaire protectrice. En effet, la rate est un organe lymphoïde secondaire, haut lieu d'initiation de réponses immunitaires. De plus, notre équipe a mis en évidence une accumulation du FVIII injecté dans la rate ainsi que l'importance de cet organe dans le développement de la réponse anti-FVIII chez la souris [74]. Ainsi ai-je recherché un rôle des plaquettes dans la réponse anti-FVIII chez les souris hémophiles A, de même que des éléments suggérant que ce rôle pouvait passer par l'activation des PAR par la thrombine. L'élimination des plaquettes de souris hémophiles A avant l'injection de FVIII exogène conduisait à une réduction importante de la réponse anti-FVIII, par rapport à des souris

injectées sans élimination préalable des plaquettes. Par ailleurs, l'élimination des plaquettes n'empêchait pas le FVIII injecté de s'accumuler dans la rate des souris déficientes en FVIII. Le blocage de la voie d'activation des plaquettes par l'ADP, par l'inhibition du récepteur P₂Y₁₂, ne conduisait pas à une diminution de la réponse anti-FVIII, contrairement à l'inhibition de la voie d'activation des plaquettes par la thrombine grâce aux peptides inhibiteurs de PAR1, 2 et 4. Mes résultats montrent un rôle des plaquettes dans l'immunogénicité du FVIII exogène chez les souris hémophiles A. Ce rôle n'est pas lié au transport du FVIII dans la rate par les plaquettes, mais est associé à l'activation des PAR, ce qui suggère une implication de la thrombine dans l'effet observé dans le modèle murin d'hémophilie A.

Regular article: Thrombosis and Hemostasis

Title: Adjuvant role of platelets in the immunogenicity of therapeutic factor VIII in hemophilic mice

Short title: Role of platelets in the anti-FVIII immune response

Maud Teyssandier, Sandrine Delignat, Julie Rayes, Ivan Peyron, Jagadeesh Bayry, Christophe Klein, Srinivas V Kaveri, Sébastien Lacroix-Desmazes

¹INSERM, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006

²Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006

³Université Paris Descartes, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006

⁴International Associated Laboratory IMPACT, INSERM, France

Address correspondence to: Sébastien Lacroix-Desmazes at INSERM UMR 872 Equipe 16, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, F-75006 France - Tel: 01 44 27 82 02 - Fax: +33 1 44 27 81 94 - Email: Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Word count in abstract: 192

Word count in text: 3764

Number of figures: 5

Number of tables: 0

Number of supplementary figures: 0

Number of references: 37

Keywords : Factor VIII, FVIII inhibitor, Immunogenicity, hemophilia A, platelets

Abstract

Replacement therapy with exogenous factor VIII (FVIII) in patients with hemophilia A results, in up to 30% of the cases, in the emergence of inhibitory anti-FVIII IgG. The immunogenicity of FVIII has been attributed at least in part to its capacity to generate thrombin that, in turn, activates the pro-inflammatory protease-activated receptors (PARs). Because PARs are expressed on platelets and because platelets participate in the generation of antigen-specific humoral responses, we investigated the contribution of platelets to the anti-FVIII immune response. The onset of inhibitory anti-FVIII IgG was studied in FVIII-deficient mice after antibody-mediated platelet depletion, administration of PAR inhibitors or chemical blocking of platelet activation. Both the depletion of platelets and inhibition of PARs led to a reduction in the immunogenicity of FVIII, that was not reproduced when platelets were blocked with clopidogrel. Platelets however did not mediate the accumulation of FVIII in the spleen. Human platelets induced dendritic cells maturation and T-cell proliferation *in vitro* irrespective of the presence of FVIII. Taken together, our results suggest that platelets participate in bringing about inflammatory signals that play an adjuvant role in the immune response to exogenously administered FVIII under hemophilic conditions.

Introduction

Hemophilia A (HA) is an hemorrhagic disorder that results from a lack or a deficiency in pro-coagulant factor VIII (FVIII).¹ FVIII is a key protein in the blood coagulation cascade. Upon activation, FVIII integrates the tenase complex (activated FIX, FX and phospholipids) at the surface of activated platelets or endothelial cells. This complex leads to the generation of activated FX (FXa), thrombin and, ultimately, fibrin that consolidates the platelet clot.² The most efficient treatment of bleeding episodes in HA patients consists in the intravenous (iv) administration of therapeutic FVIII. Unfortunately, in up to 30 % of the patients, treatment with exogenous FVIII results in the emergence of anti-FVIII IgG that inhibit the therapeutic FVIII.³ The immunogenicity of therapeutic FVIII is unexpected since FVIII is injected intravenously, a notoriously non-immunogenic route, in relatively low amounts and, obviously, in the absence of adjuvant.

For an immune response to develop, the target antigen needs to be endocytosed by antigen-presenting cells (APCs). Provided that appropriate maturation signals are available in the vicinity of the encounter of antigen with APCs, APCs will present the processed antigen to naïve antigen-specific T cells together with indispensable co-stimulatory signals. While the endocytosis of FVIII by APCs and its presentation to FVIII-specific T cells has been studied both in human and mice,⁴⁻⁷ the nature of the signals that promote the maturation of APCs at the time of FVIII uptake, leading to the triggering of naïve T cells, remains uncharacterized. Among the possible sources of maturation signals (also called danger signals), a direct contribution of FVIII has been proposed that results from the capacity of activated FVIII to generate a burst in thrombin production. In the coagulation cascade, thrombin activates several coagulation factors including FVIII and factor V, and cleaves fibrinogen into fibrin. Thrombin is also an agonist of protease-activated receptors (PARs), which are expressed on different cell types, in particular endothelial cells and platelets. PAR signaling on platelets and

endothelial cells leads to the release of different pro-inflammatory mediators and chemokines, including reactive oxygen species, CD154 (CD40-ligand), IL-1- β , MCP1, IL-6, IL-8 and RANTES.⁸ Using FVIII-deficient mice as a model of severe hemophilia A, Skupsky *et al* have shown that thrombin plays a role in the initiation of the anti-FVIII immune response.⁹ The latter finding remains however controversial since FVIII variants devoid of pro-coagulant activity were recently shown to present with the same degree of immunogenicity as native FVIII.¹⁰

Platelets are highly reactive components of hemostasis and wound repair systems that are at play following vascular injury.¹¹ More recently, a role for platelets in the regulation of immunological and inflammatory processes has been uncovered. Thus, platelets, by virtue of their capacity to release a wide range of inflammatory mediators, are essential actors of the inflammatory processes that lead to atherosclerosis, a chronic inflammation affecting arterial blood vessels.⁸ Furthermore, Elzey *et al* have demonstrated a key role for platelets in the formation of antigen-specific antibodies in mice.¹² In the present study, we investigated whether platelet are implicated in the immune response to FVIII in FVIII-deficient mice.

Methods

Preparation of FVIII

All *in vivo* and *in vitro* experiments were performed using Helixate® (a kind gift from CSL-Behring, Marburg, Germany), a human recombinant full length FVIII produced in baby hamster kidney cells. FVIII was directly diluted in phosphate buffered saline (PBS) for replacement therapy in FVIII-deficient mice (i.e., 1 IU FVIII/injection). In other *in vivo* or *in vitro* experiments, FVIII was dialyzed against RPMI for 2 h at 4°C. After dialysis, FVIII:Ag and FVIII:C were systematically quantified by Bradford, Asserachrom kit (Stago, Asnières sur Seine, France) and chromogenic assay (Siemens, Marburg, Germany).

Mice

Mice were 7 to 10-week-old inbred 129xC57BL/6 (H-2Db background) exon 16 FVIII-deficient males (a gift from Prof H.H. Kazazian, Jr and Dr R. Sarkar, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia). Mice were administered human recombinant FVIII (1 IU or 500 IU) diluted in PBS or PBS only, by retro-orbital iv injection once a week for up to 4 weeks. In some experiments, mice received 5 minutes before FVIII injection 20 µg of the R300 rat anti-mouse CD42b platelet-depleting antibody or of an isotypic control antibody (Emfret analytics, Eibelstadt, Germany), a cocktail of PAR1, PAR2 and PAR4 inhibitory peptides (200 µg of each, peptides international, Louisville, KY, USA) diluted in PBS, or PBS only. In other experiments, mice were fed 0.33 mg/ml clopidogrel (Plavix® Sanofi, Paris, France) in drinking water for 7 days prior to FVIII injection and during the treatment period. A water consumption of 15 ml/100 g per 24 h was assumed to provide an estimated daily intake of 50 mg/kg clopidogrel per mouse.¹³ Blood was collected by retro-orbital puncture at the end of the third and fourth week after the first administration of FVIII. Serum was kept at -20°C until use. Groups of five to ten mice were used in each set of

experiments. Animals were handled in agreement with local ethical authorities (Comité régional d'éthique Ce5/2010/045).

Titration of anti-FVIII IgG

Plates for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with FVIII (2 µg/ml; Recombinate®, Baxter, Maurepas, France) overnight at 4°C, and blocked with PBS, 1 % bovine serum albumin. Mouse serum was then incubated in dilutions for 1 h at 37°C. Bound IgG were revealed using a peroxidase-coupled goat monoclonal anti-mouse IgG (Southern Biotech, Anaheim, CA, USA) and substrate. A mouse monoclonal anti-FVIII IgG (mAb) was used as a standard. Results are expressed in µg/ml mAb-equivalent. The use of Helixate® or Recombinate® as a coated FVIII antigen yielded identical results in ELISA (data not shown).

Titration of FVIII inhibitors

Serum was incubated with standard human plasma (Siemens) for 2 h at 37°C. The residual pro-coagulant FVIII activity was measured using a chromogenic assay following the manufacturer's recommendations (Siemens). Inhibitory titers, expressed in Bethesda units (BU)/ml of serum, were calculated as described elsewhere.¹⁴ Bethesda titers are defined as the reciprocal of the dilution of serum that yields 50 % residual FVIII activity.

Mouse T-cell proliferation

Spleens were recovered 3 days after the injection of FVIII. Splenocytes (0.25×10^6 cells/well) were incubated in triplicates for 72 h alone, with FVIII (0.1, 1 and 10 µg/ml) or with concanavalin A (2 µg/ml). Cell proliferation was measured by incorporation of [³H]-thymidine (0.5 µCi/well) for an additional 20 hr, and is expressed as counts per minute or

stimulation index that represents the ratio of the cpm measured in the presence of antigen with respect to the proliferation measured in culture medium alone.

Purification of human platelets

Platelets were obtained from healthy volunteers who had not taken medication for 10 days. Blood was collected on citrate-dextrose anticoagulant to prepare washed platelets as previously reported.¹⁵ The purity and state of activation of the purified platelets was monitored by flow cytometry using cell size (forward scatter), granularity (side scatter), and the expression of CD41 and low expression of CD62P.

Human naive T-cell activation

Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy individuals using CD14 microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and were differentiated into immature dendritic cells (MO-DCs) upon incubation with GM-CSF (1000 IU/million cells) and IL-4 (500 IU/million cells) for 5 days. Immature MO-DCs were pulsed in serum free X-VIVO 15 medium with 20 µg/ml FVIII (Helixate®). After 2 hr, purified human platelets were added to MO-DCs at 1:0, 1:50 or 1:100 MO-DC/platelet ratios, and 2 IU/ml of thrombin were added to activate the platelets. Platelets fixed with 4% of paraformaldehyde were used as a control. As a positive control for induction of maturation, MO-DCs were incubated with 1 µg/ml LPS and 10 ng/ml TNF-α. After 48 hr of incubation, DCs were harvested. Part of the DCs was analyzed for the expression of surface markers by flow cytometry (LSR II, BD Biosciences) using antibodies specific for HLA-DR and CD83. Autologous CD4⁺ T cells were negatively purified from frozen PBMCs using microbeads (Miltenyi Biotec) and depleted of the CD25^{high} regulatory T cells.¹⁶ The CD4⁺ T cells were stained with cell trace violet (molecular probes®, Invitrogen, Saint Aubin, France) and

incubated with the rest of the MO-DCs in 96-well round bottom plates for 7 days with at 1:40 DC/T-cell ratio. Cells were then collected and stained with an anti-human CD4 antibody conjugated to APC. The proliferation of CD4⁺ T cells was analyzed by flow cytometry after exclusion of the dead cells with propidium iodide staining.

In situ detection of FVIII by immuno-histochemistry.

Mice received a retro-orbital injection of 20 µg of R300 or of the isotype control antibody. Five min later, mice were injected with 10 µg of FVIII (Helixate®) diluted in PBS. Mice were sacrificed 30 min later, spleens were collected and snap-frozen in liquid nitrogen. Serial cryosections (10 µm) were air-dried fixed in acetone. FVIII was detected with a sheep polyclonal anti-human FVIII IgG (Kordia, Leiden, Netherlands) followed by a donkey anti-sheep IgG conjugated to Alexa Fluor 647 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Metallophilic macrophages were detected with a rat monoclonal antibody anti-Siglec-1 conjugated to FITC (Abd Serotec, Kidlington, UK). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 and tissue sections were mounted with ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen). Image acquisition was performed with an Axiovert® M200 microscope (Zeiss) equipped with Apoptome®.

Quantification of FVIII co-localisation with metallophilic macrophages.

Digital images were analyzed with the ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). An ImageJ macro was written to automatically measure signal intensities for Siglec-1 and FVIII, and co-localization. Background fluorescence values were determined by automatic threshold using the ‘moments’ algorithm. Threshold values were subtracted from the original images and the Integrated Optical Density (IOD, i.e., the sum of the gray level of all pixels) was measured to quantify FVIII and Siglec-1 signal intensity. The background signal measured in control PBS-treated mice was subtracted from the signal

measured in FVIII-treated mice. Co-localization of FVIII with Siglec-1 was evaluated as the sum of the gray level of all pixels in the FVIII image for which the grey level in the Siglec-1 image respectively was also above the threshold, divided by the IOD of the FVIII image. For each tissue section, images from 5 fields were analyzed at a 40X magnification; data were averaged. Images were focused on fields that included red pulp, marginal zone and white pulp.

Results

The depletion of platelets reduces the immunogenicity of FVIII in FVIII-deficient mice

We first investigate the importance of the presence of platelets in the initiation of the anti-FVIII immune response in FVIII-deficient mice. To this end, naïve mice were treated at day 0 and at day 10 with the platelet-depleting rat monoclonal antibody R300 that is directed against mouse GPIb (CD42b); control mice received an irrelevant isotype-matched rat antibody control.¹⁷ All mice received 1 IU FVIII immediately after each injection of antibodies, and a second injection a week later. Efficient platelet depletion was confirmed on whole blood by flow cytometry using an anti-CD41 antibody (data not shown). Control mice displayed a robust anti-FVIII immune response, as shown by the levels of anti-FVIII IgG (1186.7 ± 202.1 $\mu\text{g/ml}$, Fig 1A) and by the inhibitory titer in serum (28 ± 14 BU/ml, Fig 1B). Conversely, R300-treated mice demonstrated drastically reduced levels of anti-FVIII IgG (173.5 ± 45.1 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.0001$ as compared to control mice) and inhibitory titers (6 ± 2 BU/ml, $P < 0.01$). Cell proliferation was assessed *in vitro* on purified splenocytes by incorporation of [³H]-thymidine. Splenocytes from both the groups of mice proliferated to identical levels in the presence of concanavalin A, a lymphocyte mitotic inducer (data not shown) and proliferated in a manner dependent on the concentration of FVIII (Fig 1C, inset in the case of control mice). Interestingly, splenocytes from R300-treated mice proliferated significantly less than that of control mice in the presence of FVIII ($P < 0.01$, Fig 1C).

In order to confirm the latter data, we adapted an alternative strategy for antigenic challenge.¹² Naïve FVIII-deficient mice received either the R300 platelet-depleting antibody or the isotype control once a day for 3 consecutive days; all mice received a single bolus dose of FVIII (500 IU) immediately after the first antibody administration on day 0. Levels of anti-FVIII inhibitory IgG were measured after three weeks by ELISA and Bethesda assay. In agreement with the previous set of experiments, R300-treated mice displayed drastically reduced anti-

FVIII IgG levels and inhibitor titers as compared to control mice (Fig 2, 332.6 ± 142.1 vs 1547.5 ± 372.7 $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$ and 2 ± 1 vs 49 ± 26 BU/ml, $P < 0.05$; respectively).

Distribution of FVIII in the spleen of FVIII deficient mice

We and others have demonstrated previously that exogenously administered FVIII accumulates in the spleen of FVIII-deficient mice.^{18,19} A role for platelets has been suggested in the transport of pathogens to the spleen.²⁰ We examined whether platelets mediate FVIII accumulation in the marginal zone of the spleen. Naïve FVIII-deficient mice were treated with R300 or isotype control antibody, and received PBS or 10 μg FVIII. In a naïve mouse treated with the isotype control antibody, FVIII preferentially accumulated in the marginal zone of the spleen (Fig 3, left panel), at the level of Siglec-1-positive metallophilic macrophages (Fig 3, middle and right panels), as previously reported.¹⁹ Thus, $37.4 \pm 4.5\%$ (mean \pm SEM) of the detected FVIII co-localized with metallophilic macrophages. Interestingly, the depletion of platelets using R300 did not alter the capacity of FVIII to accumulate in the marginal zone of the spleen (Fig 3B, $4.5 \cdot 10^6 \pm 0.7 \cdot 10^6$ AU) as compared to the isotype control-treated mice ($5.5 \cdot 10^6 \pm 1.1 \cdot 10^6$ AU) and did not modulate the capacity of FVIII to co-localize with metallophilic macrophages (Fig 3D, $35.7 \pm 4.2\%$).

Inhibition of PAR-signaling and P2Y12-signaling pathways in FVIII-deficient mice

We then inspected whether the inhibition of platelet activation at the time of FVIII administration may reduce FVIII immunogenicity *in vivo*. We first inhibited thrombin-mediated signaling by injecting the mice with a mix of PAR1, PAR2 and PAR4 inhibitory peptides, immediately before the administration of 1 IU of FVIII. Mice treated with inhibitory peptides to PARs developed significantly lower levels of anti-FVIII IgG (236.0 ± 41.0 $\mu\text{g/ml}$) as compared to PBS-treated mice (521.4 ± 64.5 $\mu\text{g/ml}$, $P = 0.014$) (Fig 4A).

In another series of experiments, mice were fed with clopidogrel, a specific inhibitor of the P2Y₁₂-signaling pathway that is required for optimal ADP-mediated platelet activation.²¹ Platelets from clopidogrel-fed mice were resistant to ADP-mediated activation, as shown by a lack of expression of CD62P and GPIIb/IIIa by platelets exposed *in vitro* to ADP in whole blood (data not shown). Clopidogrel-fed mice and control mice mounted anti-FVIII immune responses with similar intensities (189.8±21.5 µg/ml and 197.5±25.1 µg/ml, respectively, P=0.809, Fig 4B).

Platelets induce the maturation of MO-DCs in vitro

Lastly, we investigated *in vitro* whether the presence of therapeutic FVIII modulates the maturation of human monocyte-derived dendritic cells by thrombin-activated platelets. Immature human MO-DCs were incubated alone or with FVIII and thrombin, in the presence of non-activated fixed platelets. The activation of MO-DCs was studied by the levels of expression of MHC class II (HLA-DR, Fig 5A) and CD83 (Fig 5B). Incubation of MO-DCs with LPS and TNF-α for 48 hr, resulted in the over-expression of MHC II and CD83 as compared to untreated platelets, indicating acquisition of a mature state of the cells. Interestingly, addition of fully functional platelets to MO-DCs induced expression levels of HLA-DR and CD83, that were close to that generated by LPS and TNF-α, while fixed non-activated platelets only activated MO-DCs to a marginal extent. DC maturation was dependent on the number of platelets added to the culture wells. Platelet-activated MO-DCs stimulated the proliferation of naive CD4⁺ T cells from healthy donors depleted of CD4⁺ CD25^{high} T cells. The maturation profiles of MO-DCs and levels of T cell proliferation were identical whether FVIII alone or with thrombin had been added to the co-cultures or not (Fig 5 and data not shown), suggesting that purified functional platelets get spontaneously activated *in vitro* when co-cultured with MO-DCs and that thrombin is not required in the

process. The data also suggest that FVIII does neither reduce nor facilitate platelet-mediated MO-DCs maturation.

Discussion

A role for platelets as adjuvants of immune responses had been documented previously. Indeed, Elzey *et al* showed that depletion of platelets in normal mice results in decreased antigen-specific antibody responses.¹² Further, a pathogenic inflammatory role for platelets has been established in arthritis²² and immune thrombocytopenic purpura.²³ To confirm a role for platelets in the immunogenicity of exogenous FVIII, we first depleted platelets from FVIII-deficient mice using the anti-CD42b R300 antibody prior to FVIII administration. To this end, we developed two experimental protocols. In the first, mice were treated twice with a depleting dose of R300 (or isotype control) prior to replacement dose of exogenous FVIII and received an additional boost of FVIII alone. The elimination of platelets was associated with a 6-fold reduction of the levels of inhibitory anti-FVIII IgG, and with a reduction in the generation of FVIII-reactive CD4⁺ T cells. The treatment was however also associated with an elevated mortality of the mice linked to hemorrhages, probably owing to the concomitant absence of FVIII and platelets. We thus developed an alternative protocol wherein a bolus of FVIII was injected at a high dose on day 0 and platelets were depleted only between days 0 to 2. In the latter case, we did not observe an increased mortality of the mice, and the anti-FVIII immune response was at least 4-fold lower in treated animals as compared to controls.

Different signaling pathways have been shown to lead to platelet activation. Here, we investigated the importance of the triggering of PARs by thrombin and of P2Y₁₂ by ADP.²⁴ Our results indicate that inhibition of P2Y₁₂-signaling by clopidogrel *in vivo* does not have a significant repercussion on the intensity of the anti-FVIII immune response in hemophilic mice. In contrast, blocking PARs using specific inhibitory peptides to PAR₁, 2 and 4 at the time of FVIII administration was associated with a 2.2-2.5-fold reduction in the anti-FVIII immune response. PARs are a family of four different receptors, of which PAR₁, 3 and 4 may be triggered by thrombin,²⁵⁻²⁷ leading to the delivery of potent pro-inflammatory signals. Our

data thus support previous work demonstrating that generation of thrombin, subsequent to the intravenous administration of exogenous FVIII to FVIII-deficient mice, participates in the initiation of the immune response to FVIII. Indeed, the inhibition of thrombin by hirudin at the time of exogenous FVIII administration in FVIII-deficient mice was associated with a 3-fold decrease in the intensity of the anti-FVIII immune response.⁹ Furthermore, co-injection of regular Balb/c mice with ovalbumin (OVA) and thrombin induced ovalbumin-specific IgG and CD4⁺ T cells, that was not found when ovalbumin was injected alone.⁹ PARs are differentially expressed on platelets and on endothelial cells, both in human and mice. Thus, mouse platelets express only PAR3 and PAR4, while mouse endothelial cells express at least PAR1, 2 and 4.^{27,28} To our knowledge, inhibitory peptides for PAR3 are not available. PAR3 has been proposed to act as a co-receptor for PAR4 and is not able to signal by itself in response to thrombin, in contrast to PAR4.²⁹ Besides, although we have used an inhibitory peptide to PAR2, PAR2 is not typically activated by thrombin.³⁰

Our data suggest that platelet activation, concomitant with or resulting from the administration of exogenous FVIII, participates in the immunogenicity of the therapeutic molecule. A spontaneous state of activation of platelets in patients with severe hemophilia A, as well as their capacity for being activated *in vitro*, has been investigated recently with contradictory conclusions. van Bladel et al. thus reported that the state of activation of platelets is up-regulated in patients with severe HA, while an earlier study had failed to find signs of enhanced platelet pre-activation in the patients.^{31,32} Using FVIII-deficient mice, in an *in vivo* situation that is not perturbed by the different genetic or environmental factors that are typical of the human population, we have recently demonstrated that the absence of pro-coagulant FVIII in un-manipulated adult hemophilic mice is associated neither with alterations in the activation status of circulating platelets nor with their ability to be activated.³³ The situation may however be different under bleeding conditions where

exogenous FVIII is introduced in the circulation at a time when the activated platelet aggregate is not stabilized at the bleeding site.

Several mechanisms have been elucidated that explain the activation of the immune system by platelets. Platelets have thus been demonstrated to directly induce the maturation of dendritic cells *in vitro*,^{34,35} an observation that we confirm in the present work. We also show that platelet-matured MO-DCs induce the proliferation of naïve T cells. In our hands, induction of the maturation of MO-DC was independent of the presence of FVIII. Similarly, addition of thrombin did not increase the capacity of platelets to trigger MO-DC maturation, probably due to the fact that purified platelets spontaneously activate when cultured *in vitro*, unless blocked by specific inhibitors.³⁶ Our results on T-cell activation also suggest that activated T cells are not specific for FVIII, since T-cell proliferation was also induced by platelet-matured MO-DCs incubated without FVIII.

We and others have demonstrated previously that exogenously administered FVIII accumulates in the spleen of FVIII-deficient mice,¹⁸ preferentially in the marginal zone at the level of metallophilic macrophages,¹⁹ and that vWF is not required in the process.⁶ Surgical removal of the spleen was shown to reduce the anti-FVIII immune response, thus demonstrating the importance of the spleen in the initiation of response.¹⁹ Interestingly, platelets have been shown to transport blood-borne pathogens to the spleen in a manner dependent on GPIb and complement C3, thus allowing specific T-cell priming.²⁰ Our present results suggest that platelets are not implicated in the accumulation of therapeutic FVIII in the marginal zone of the spleen: the amount and localization of FVIII in the marginal zone of the spleen was identical in platelet-depleted and control animals. The latter results may be due to the protective effect of von Willebrand factor that prevents circulating FVIII from interacting with activated platelets,³⁷ and/or to the fact that our experiments³⁷ are performed in animals that, unlike hemophilia A patients, do not show signs of recurrent spontaneous bleeds.

Taken together, our results suggest that platelets participate in bringing about inflammatory signals that play an adjuvant role in the immune response to exogenously administered FVIII under hemophilic conditions. Whether platelets, antigen-presenting cells and FVIII encounter at the site of clot formation or at the site of initiation of the immune response to blood-borne antigens (that is, the spleen) remains to be investigated.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Cécile Denis and Marijke Bryckaert (INSERM U770, Le Kremlin-Bicêtre, France), and Dr Martine Jandrot-Perrus (INSERM U698, Paris, France) for introducing us the World of platelets and to the techniques for platelet purification.

This work was supported by INSERM, by CNRS, by UPMC-Paris6, and by the 2008 “Prof. Heimburger award” from CSL-Behring (Marburg, Germany). MT was the recipient of fellowships from Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de la Technologie (MERT, Paris, France) and Fondation pour le Recherche Médicale (Paris). Helixate® was a gift from CSL-Behring.

Authors contributions

Designed research: MT, SD, JB, SLD

Performed research: MT, SD, JR, IP, CK

Analyzed data: MT, SD, JR, CK, JB, SLD

Wrote the paper: MT, SVK, SLD

Disclosure of conflict of interests

The authors declare no conflict of interest

References

1. Hoyer L. Hemophilia A. *New Eng J Med*. 1994;330:38-47.
2. Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*. 1991;30(43):10363-10370.
3. Oldenburg J, Pavlova A. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. *Haemophilia*. 2006;12 Suppl 6:15-22.
4. Dasgupta S, Navarrete AM, Bayry J, et al. A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(21):8965-8970.
5. Dasgupta S, Repesse Y, Bayry J, et al. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood*. 2007;109(2):610-612.
6. Delignat S, Repesse Y, Navarrete AM, et al. Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A. *Haemophilia*. 2012;18(2):248-254.
7. Wroblewska A, van Haren SD, Herczenik E, et al. Modification of an exposed loop in the C1 domain reduces immune responses to factor VIII in hemophilia A mice. *Blood*. 2012;119(22):5294-5300.
8. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007;357(24):2482-2494.
9. Skupsky J, Zhang AH, Su Y, Scott DW. A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood*. 2009;114(21):4741-4748.
10. Meeks SL, Cox CL, Healey JF, et al. A major determinant of the immunogenicity of factor VIII in a murine model is independent of its procoagulant function. *Blood*. 2012.
11. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000;355(9214):1531-1539.

12. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*. 2003;19(1):9-19.
13. Lauer A, Schlunk F, Van Cott EM, Steinmetz H, Lo EH, Foerch C. Antiplatelet pretreatment does not increase hematoma volume in experimental intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(8):1736-1742.
14. Kasper CK, Aledort LM, Counts RB. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975;34:869-872.
15. Jandrot-Perrus M, Didry D, Guillin MC, Nurden AT. Cross-linking of alpha and gamma-thrombin to distinct binding sites on human platelets. *Eur J Biochem*. 1988;174(2):359-367.
16. Kamate C, Lenting PJ, van den Berg HM, Mutis T. Depletion of CD4(+)CD25(high) regulatory T cells may enhance or uncover factor VIII-specific T cell responses in healthy individuals. *J Thromb Haemost*. 2007;5:611-613.
17. Bergmeier W, Rackebrandt K, Schroder W, Zirngibl H, Nieswandt B. Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies. *Blood*. 2000;95(3):886-893.
18. van Schooten CJ, Shahbazi S, Groot E, et al. Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood*. 2008;112(5):1704-1712.
19. Navarrete A, Dasgupta S, Delignat S, et al. Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A. *J Thromb Haemost*. 2009;7(11):1816-1823.
20. Verschoor A, Neuenhahn M, Navarini AA, et al. A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8alpha+ dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3. *Nat Immunol*. 2011;12(12):1194-1201.

21. Cattaneo M, Lecchi A, Randi AM, McGregor JL, Mannucci PM. Identification of a new congenital defect of platelet function characterized by severe impairment of platelet responses to adenosine diphosphate. *Blood*. 1992;80(11):2787-2796.
22. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science*. 2010;327(5965):580-583.
23. Solanilla A, Pasquet JM, Viallard JF, et al. Platelet-associated CD154 in immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2005;105(1):215-218.
24. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2341-2349.
25. Cirino G, Cicala C, Bucci MR, Sorrentino L, Maraganore JM, Stone SR. Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *J Exp Med*. 1996;183(3):821-827.
26. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258-264.
27. Kataoka H, Hamilton JR, McKemy DD, et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood*. 2003;102(9):3224-3231.
28. Park Y, Yang J, Zhang H, Chen X, Zhang C. Effect of PAR2 in regulating TNF-alpha and NAD(P)H oxidase in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(1):111-123.
29. Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*. 2000;404(6778):609-613.
30. Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther*. 2011;130(3):248-282.
31. van Bladel ER, Roest M, de Groot PG, Schutgens RE. Up-regulation of platelet activation in hemophilia A. *Haematologica*. 2011;96(6):888-895.

32. Grunewald M, Siegemund A, Grunewald A, Konegen A, Kokschi M, Griesshammer M. Absence of compensatory platelet activation in patients with severe haemophilia, but evidence for a platelet collagen-activation defect. *Platelets*. 2002;13(8):451-458.
33. Teyssandier M, Delignat S, Rayes J, et al. Activation state of platelet in experimental severe hemophilia A. *Haematologica*. 2012.
34. Nguyen XD, Muller-Berghaus J, Kalsch T, Schadendorf D, Borggrefe M, Kluter H. Differentiation of monocyte-derived dendritic cells under the influence of platelets. *Cytotherapy*. 2008;10(7):720-729.
35. Hilf N, Singh-Jasuja H, Schwarzmaier P, Gouttefangeas C, Rammensee HG, Schild H. Human platelets express heat shock protein receptors and regulate dendritic cell maturation. *Blood*. 2002;99(10):3676-3682.
36. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest*. 1996;97(6):1525-1534.
37. Nesheim M, Pittman DD, Giles AR, et al. The effect of plasma von Willebrand factor on the binding of human factor VIII to thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem*. 1991;266:17815-17826.

Figure legends

Figure 1. The depletion of platelets reduces the immunogenicity of FVIII in FVIII-deficient mice. FVIII-deficient mice received 2 intravenous administrations (iv) 10 days apart of 20 µg of an irrelevant polyclonal antibody (isotopic control, isotype) (n=10, full squares), or of 20 µg of the R300 platelet-depleting antibody (n=8, empty squares). Mice received 1 IU FVIII iv after each injection of antibodies. Seven days after the last injection, all mice were administered iv with 1 IU FVIII. Three days later, mice were anaesthetized to collect spleens and blood by intra-cardiac puncture. Levels of inhibitory anti-FVIII IgG were measured in the serum by ELISA (panel A) and by Bethesda assay (panel B). Results are expressed as µg/ml using a mouse monoclonal anti-FVIII IgG as a standard and as Bethesda units (BU)/ml, respectively (mean±SEM). Splenocytes from isotype/FVIII treated mice (black bars) and R300/FVIII treated mice (empty bars) were stimulated with FVIII (0.1, 1 and 10 µg/ml) for 72 h. Cell proliferation was assessed by incorporation of [3H]-thymidine, and is expressed as stimulation index (mean±SEM, Panel C). Inset. Dose-response to FVIII (0.1, 1 and 10 µg/ml) of splenocytes isolated from an isotype/FVIII-treated mice expressed in counts per minute (cpm). Differences were compared statistically using the non-parametric Mann-Whitney test. Data are representative of two independent experiments.

Figure 2. Depletion of platelets reduces the immunogenicity of bolus-administered FVIII. FVIII-deficient mice were injected intravenously with 20 µg of isotopic control (n=6, full squares) or 20 µg of the R300 platelet-depleting antibody (n=5, empty squares). Mice received 500 IU FVIII iv immediately after the injection of antibodies. The two following days, mice received an additional injection of 20 µg of the isotopic control or of R300. Levels of inhibitory anti-FVIII IgG in serum were measured by ELISA (panel A) and by Bethesda assay (panel B). Results are expressed as µg/ml using a mouse monoclonal anti-FVIII IgG as

a standard, and as BU/ml, respectively. Differences were compared statistically using the non-parametric Mann-Whitney test. Data are representative of two independent experiments.

Figure 3. The depletion of platelets in FVIII-deficient mice does not prevent the accumulation of exogenous FVIII at the level of splenic metallophilic macrophages.

FVIII-deficient mice were injected with 20 µg of isotopic or 20 µg of R300 platelet-depleting antibody. Five minutes later, mice were injected with 10 µg FVIII or with PBS. Mice were sacrificed 30 min later. Histological frozen sections of spleen were labeled with anti-FVIII antibodies in green (panel A, left) and with anti-Siglec-1 (metallophilic macrophages) antibodies in red (panel A, middle). The co-localisation of FVIII with Siglec-1-positive metallophilic macrophages is shown in yellow by superimposition of green and red staining (Panel A, right). The signal intensity of FVIII (panel B) and Siglec-1 (panel C) labeling was measured at a 40X magnification and is expressed in arbitrary units (AU), where boxes and whiskers depict median, minimal and maximal values. Twelve to eighteen fields per tissue section were quantified. The amounts of FVIII co-localizing with Siglec-1 are expressed with respect to the total FVIII signal intensity (Panel D).

Figure 4. Inhibition of PAR- and P2Y12-signaling pathways in FVIII-deficient mice.

Panel A. Inhibition of PARs by inhibitory peptides. FVIII-deficient mice received 4 weekly intravenous (iv) injections of phosphate-buffered saline (PBS) (full squares, n=6) or a mix of PAR1, PAR2 and PAR4 inhibitory peptides (200 µg of each) (empty squares, n=7). Mice received 1 IU FVIII iv after each injection of PBS or inhibitory peptides. Data are representative of two independent experiments. Panel B. Inhibition of ADP-signaling pathway by clopidogrel. FVIII-deficient mice were fed clopidogrel (0.33 mg/ml) in drinking water for 35 days. From day 8 onwards, mice received 1 IU FVIII iv a week for 4 weeks. Inhibitory

anti-FVIII IgG were measured in serum 3 days after the last FVIII injection by ELISA, using a mouse monoclonal anti-FVIII IgG as a standard, and by Bethesda assay. Results are expressed in $\mu\text{g/ml}$ and Bethesda units (BU)/ml (mean \pm SEM). Statistical significance of the differences was assessed using the non-parametric Mann–Whitney U-test.

Figure 5. Platelets induce the maturation of monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) and activation of naïve T cells in vitro. MO-DCs (0.6×10^6 cells/well) were cultured alone, with fixed non-activated platelets (1:100 ratio), with platelets (1:50 and 1:100 ratios) or with 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS and 10 ng/ml TNF- α (TNF- α), either alone (empty bars) or in the presence of 10 $\mu\text{g/ml}$ FVIII and 2 IU/ml thrombin (FIIa) (full bars). The expression of MHC II (panel A) and CD83 (panel B) at the surface of the cells was analyzed by flow cytometry and is expressed as mean fluorescent intensities (MFI). Data are representative of three independent experiments obtained with MO-DCs from three different healthy donors. Panel C. Autologous CD4⁺ T cells were negatively purified from frozen PBMCs and depleted of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. The T cells were stained with cell trace violet and incubated with stimulated MO-DCs (Panels A and B) at a 40:1 T-cell/DC ratio. Proliferation of the CD4⁺ T cells was assessed after 7 days of culture as the % of cells with a reduced cell trace violet labeling. Representative of two independent experiments using MO-DCs and T cells from two different healthy donors.

Figure 1

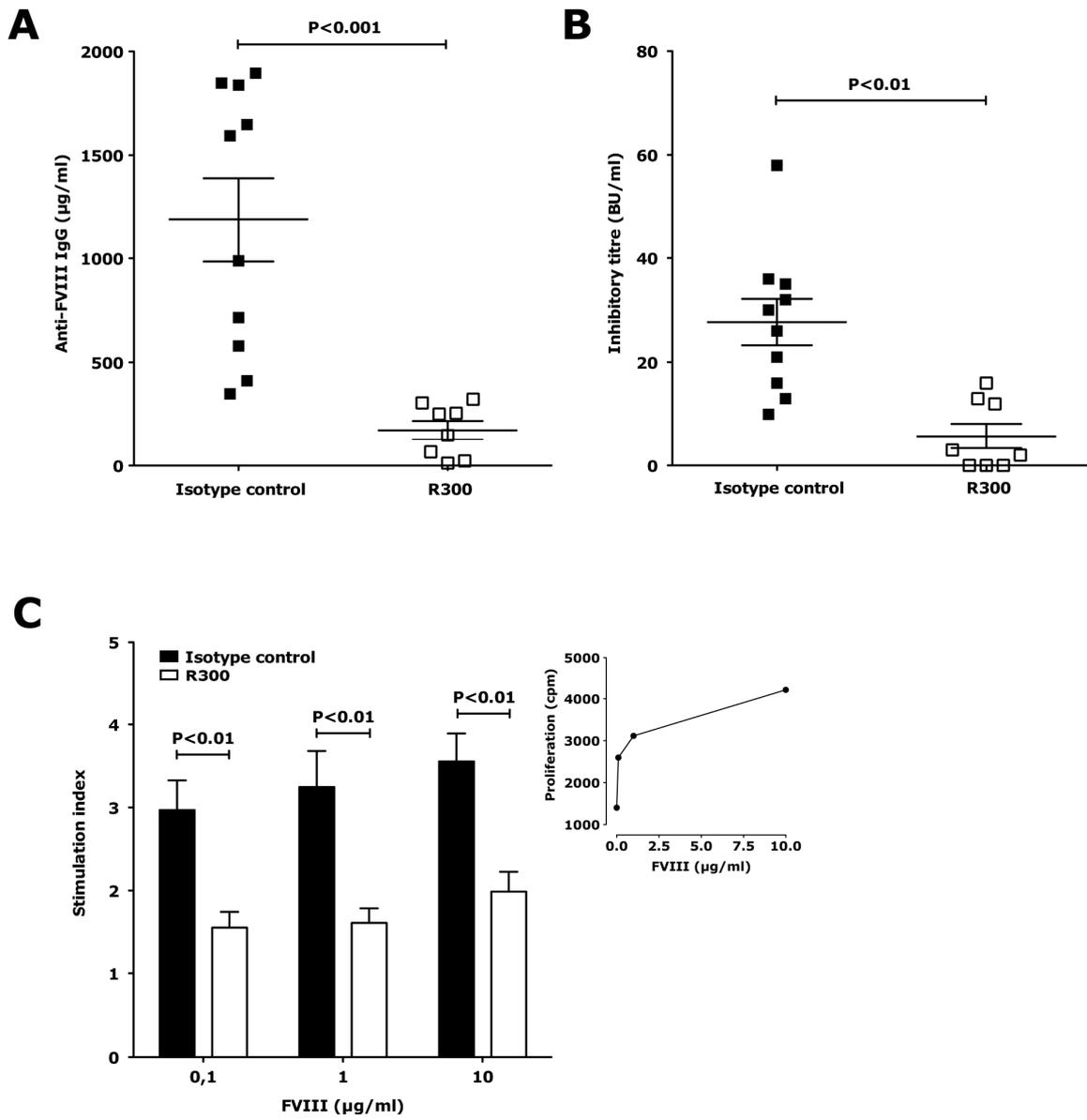


Figure 2

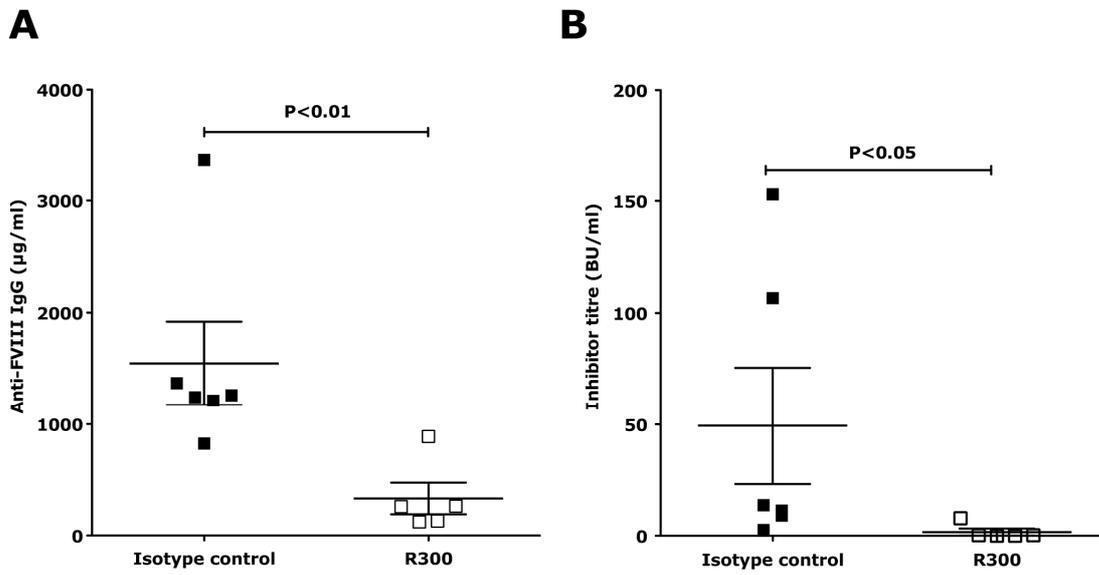


Figure 3

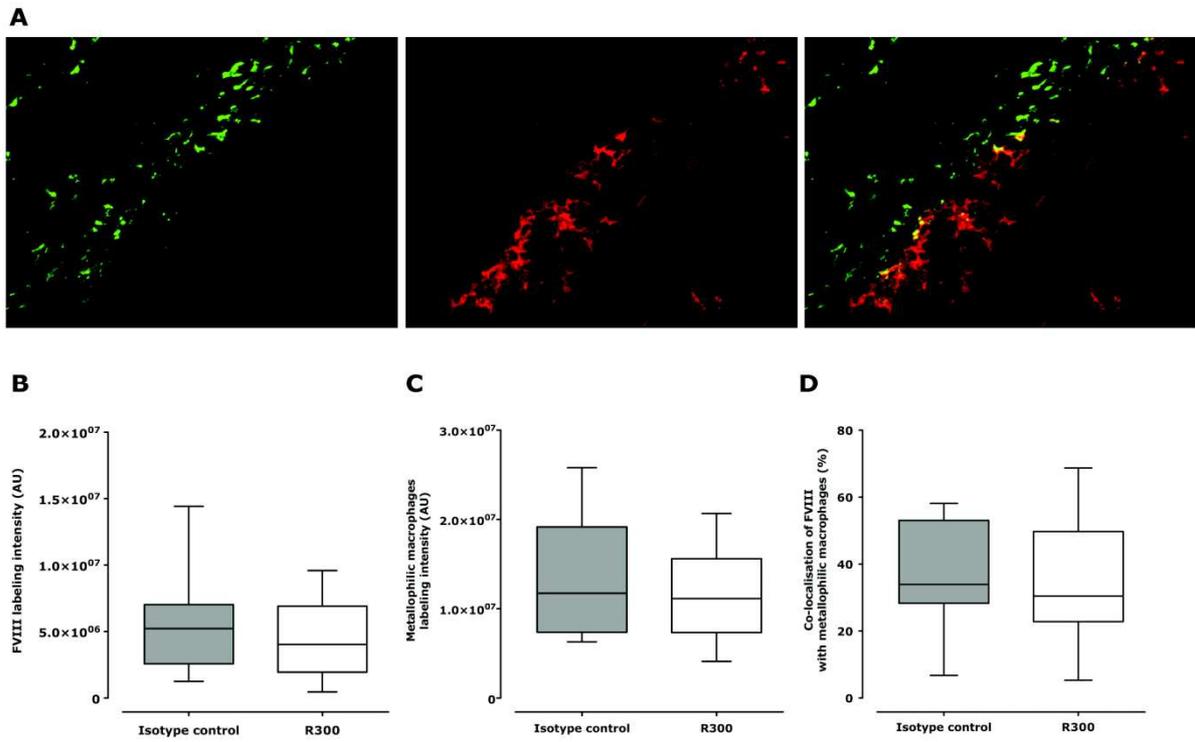


Figure 4

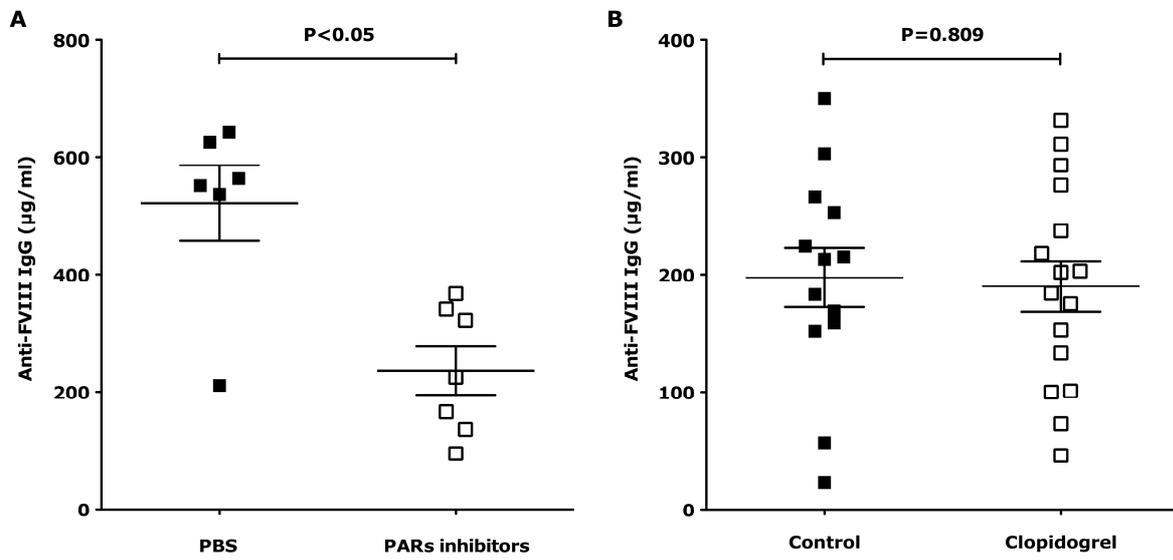
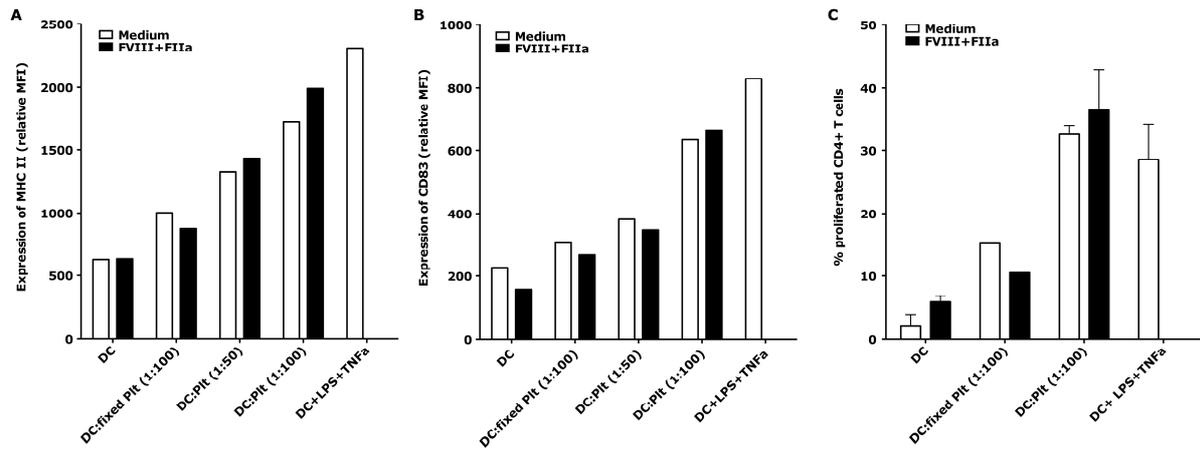


Figure 5



III- DISCUSSION

La neutralisation du FVIII thérapeutique par des anticorps inhibiteurs est la complication la plus redoutée du traitement des patients hémophiles A et conduit à une impasse thérapeutique majeure. L'objectif de ma thèse était d'identifier les signaux de danger responsables de l'initiation de la réponse immunitaire contre le FVIII exogène, afin d'ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques destinées à réduire l'immunogénicité du FVIII injecté. Je me suis plus particulièrement intéressée au rôle des TLR et des plaquettes dans l'activation du système immunitaire et à leur responsabilité éventuelle dans la stimulation de la réponse anti-FVIII. Ainsi ai-je envisagé différentes sources de signaux de danger : 1) la molécule de FVIII elle-même par interaction directe avec des récepteurs cellulaires tels que le TLR2; 2) le contexte inflammatoire d'un organisme dont la cascade de la coagulation est perturbée par l'absence de FVIII endogène, notamment l'état basal d'activation des plaquettes ; 3) le contexte inflammatoire consécutif à l'introduction de FVIII exogène dans l'organisme, laquelle entraîne la reprise soudaine de la coagulation, en recherchant un rôle des plaquettes dans la réponse anti-FVIII.

III-A.Immunogénicité intrinsèque du FVIII

Nos résultats préliminaires, évoqués dans l'introduction (paragraphe I-F.3) concernant l'immunogénicité de la chaîne légère (LCh) du FVIII, nous ont encouragés à explorer l'hypothèse selon laquelle la molécule de FVIII contient des structures capables d'entraîner la maturation des cellules innées du système immunitaire. Afin de tester cette hypothèse, j'ai recherché si l'une des chaînes du FVIII était capable de potentialiser l'immunogénicité d'une protéine qui n'induit pas de réponse immunitaire chez la souris lorsqu'elle est injectée seule : le premier domaine de l'hémagglutinine (HA1) [184]. Cette stratégie avait été développée par l'équipe de Sher et avait permis de mettre en évidence un ligand du TLR11 chez la souris grâce au couplage de la profiline à l'ovalbumine [185]. Pour cela, j'ai généré des protéines

chimériques comprenant HA1 et la chaîne lourde (HCh) ou la LCh du FVIII. Alors que le clonage et la production des fragments LCh-HA1 et HA1 seuls ont été obtenus dans des délais raisonnables, le clonage et la production du fragment HCh-HA1 se sont soldés par un échec, après plus de trois ans de tentatives. De plus, l'introduction d'une étiquette « c-myc » dans la séquence des fragments LCh-HA1 et HA1, destinée à permettre la purification des protéines sur colonne d'anticorps anti-c-myc, n'a pas fonctionné. De même, aucune des autres tentatives de purification par HPLC ou chromatographie échangeuse d'ions n'a permis de purifier les protéines recombinantes en quantités et avec une pureté suffisantes pour faire les expériences qui étaient prévues.

J'ai tout de même testé l'immunogénicité des protéines chimériques LCh-HA1 et HA1 contenues dans le surnageant de culture concentré, chez la souris déficiente en FVIII. J'ai également co-injecté HA1 avec la LCh préalablement purifiée à partir de FVIII recombinant afin de tester l'importance d'une liaison physique entre le FVIII et la molécule inerte dans l'effet potentiellement adjuvant du FVIII. Mes résultats ont montré que la réponse IgG anti-HA1 était significativement augmentée lorsque la LCh était fusionnée avec HA1 en comparaison avec l'injection de HA1 seul, contrairement à la co-injection de la LCh et du HA1 (Figure 9). Ces résultats, bien que non exploitables à des fins de publication pour l'instant, nous ont encouragés à explorer d'autres pistes afin de mettre en évidence une immunogénicité intrinsèque du FVIII, en particulier de rechercher un récepteur capable de reconnaître le FVIII et d'activer le système immunitaire.

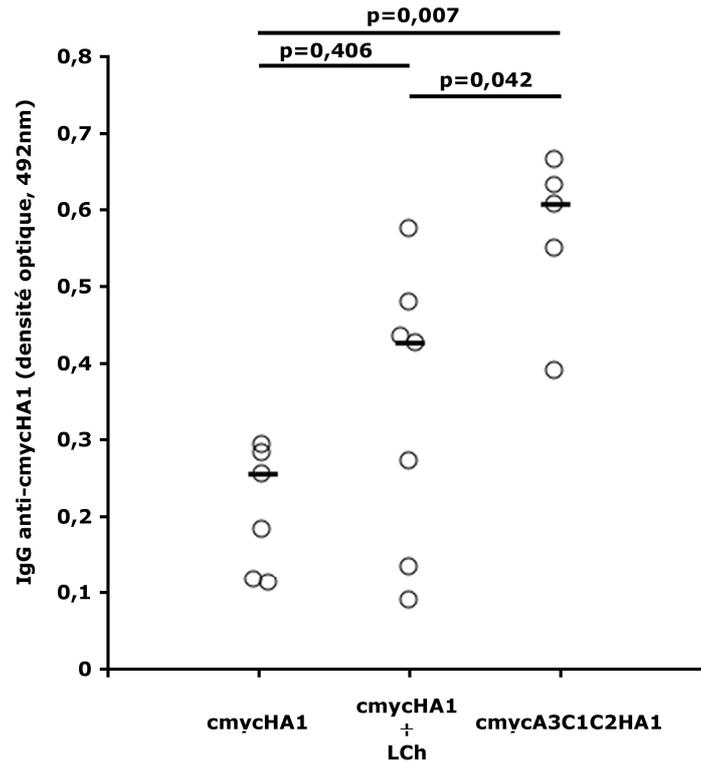


Figure 9. Immunogénicité des protéines de fusion. Les souris déficientes en FVIII ont été injectées avec les différentes protéines de fusion (1 pmol). Après la 4^{ème} injection, les IgG anti-cmyc-HA1 du sérum (dilution 1/30) ont été détectées par ELISA. Les réactivités sont décrites en unités arbitraires de densité optique mesurée à 492 nm. Les réactivités des IgG des souris des différents groupes ont été comparées deux à deux à l'aide du test non-paramétrique de Mann-Whitney. Les valeurs médianes sont représentées par une barre horizontale pour chaque groupe de souris.

Comme évoqué dans l'introduction (paragraphe I-D.2.2.1) il existe 5 principales familles de PRR : les TLR, les NLR, les CTL, les RLR et les AIM2-like receptors. Les deux dernières familles de récepteurs reconnaissent des acides nucléiques et ne sont donc vraisemblablement pas impliquées dans la reconnaissance du FVIII. Les CTL représentent une immense famille de récepteurs dont certains, comme le CD206 [186] ou le DCIR-2 [187], sont plutôt des récepteurs d'endocytose conduisant à une présentation antigénique par les molécules du CMH, et d'autres, comme le Dectin-1 [188], ont la capacité d'activer les CPA et d'induire l'activation des lymphocytes T (LT). Ainsi notre équipe a-t-elle montré que le CD206 pouvait endocyter le FVIII et conduire à sa présentation à un clone de LT spécifique de la molécule [77]. L'activation d'un clone T spécifique d'un antigène modélise une réponse immunitaire

secondaire plutôt que primaire, car les cellules, qui sont des cellules « mémoires », ont déjà subi une première activation et se trouvent dans un état « pré-activé » : les signaux de co-stimulation ne sont pas indispensables à leur activation et la reconnaissance du complexe CMH II/peptide suffit à induire leur activation. Par conséquent, cette étude ne permettait pas de conclure quant à la capacité du FVIII à activer un LT naïf et donc la capacité de la voie d'endocytose du CD206 à activer le système immunitaire au cours d'une réponse primaire. Les NLR quant à eux sont des récepteurs cytosoliques, or l'internalisation du FVIII implique que la molécule se retrouve dans des compartiments endosomaux, ce qui devrait exclure a priori un contact avec ce type de récepteurs. Les TLR sont les PRR les mieux caractérisés et également les mieux décrits quant à leur capacité à détecter les signaux de danger et à alerter le système immunitaire. Ce sont des récepteurs membranaires dont certains sont à la surface de la cellule et d'autres dans des compartiments cellulaires comme les endosomes.

L'hypothèse d'un effet direct du FVIII sur la maturation des cellules innées du système immunitaire peut sembler surprenante. En effet, Pfistershammer *et al.* avaient montré *in vitro* que le FVIII n'est pas capable d'induire directement la maturation de MO-DC [104], ce qui excluait une reconnaissance directe du FVIII par les PRR présents à la surface des DC. Pourtant, plusieurs études ont fait part de façon directe [179] ou indirecte [124] de la capacité du FVIII à activer le système immunitaire. Les travaux de thèse d'Amith ont suggéré que le FVIII thérapeutique était capable d'interagir avec les TLR à la surface de macrophages murins (BMC-2), de plaquettes humaines et de cellules HEK transfectées avec le TLR2 [179]. Dans cette étude, la technique utilisée pour démontrer la liaison du FVIII avec le TLR2 consistait en l'hydrolyse d'un substrat fluorescent par une sialidase : la neuraminidase 1 (Neu1), la sialidase étant activée à la suite de la liaison d'un ligand aux TLR2, 3 ou 4 [189]. L'intensité de fluorescence du substrat hydrolysé était visualisée au microscope à fluorescence puis évaluée à l'aide d'un logiciel. D'autre part, les travaux de Gaitonde *et al.*

avaient montré que les DC préparées à partir de moelle osseuse (BM-DC) de souris hémophiles A exprimaient moins de CD40 à leur surface lorsqu'elles étaient cultivées en présence de FVIII pré-incubé avec du phosphatidylinositol (PI), que lorsqu'elles étaient cultivées en présence de FVIII seul [124]. Cette étude suggérait de façon indirecte que le FVIII est capable d'induire une certaine maturation des BM-DC. En accord avec Pfistershammer, notre étude de l'activation du TLR2 par le FVIII n'a pas permis de mettre en évidence un effet adjuvant direct du FVIII sur la maturation des cellules innées du système immunitaire (Article 1). En effet, entre nos mains, le FVIII s'est révélé incapable d'induire la maturation de macrophages murins (BMA) ou d'activer le TLR2 murin (résultats non publiés) ou les TLR2 humains exprimés par les cellules HEK293.

Dans ses travaux, Amith montrait que la Neu1, initialement complexée aux TLR2, 3 et 4, est induite par la liaison d'un ligand au récepteur. Cependant, le lien entre induction de l'activité sialidase de la Neu1 et activation du TLR n'est pas clair. Cette étude pourrait donc témoigner de l'association du FVIII avec TLR2 et non de l'activation de sa voie de signalisation, à l'origine d'un signal de danger.

Dans son étude, Gaitonde précisait que l'expression du CD40 à la surface des cellules incubées avec le FVIII seul était faible, comparée à celle induite par le LPS, ce qui suggère la possibilité que l'effet observé reflète un niveau d'expression basale du CD40 par les BM-DC. En effet, le CD40 est une molécule exprimée de façon constitutive à la surface des DC et dont l'expression est fortement augmentée lors de la maturation des cellules [190]. De plus, même si l'expression du CD40 en réponse à l'incubation au FVIII-PI est statistiquement plus faible qu'en présence de FVIII seul, les moyennes de fluorescence observées dans les deux conditions sont faibles et ne reflètent probablement pas une différence biologique réelle. Néanmoins, une étude antérieure conduite par la même équipe montrait que, chez la souris déficiente en FVIII, l'immunogénicité du FVIII-PI était plus faible que celle du FVIII seul

[191]. Dans l'étude présente, le groupe montre que le PI, contrairement à d'autres particules lipidiques, n'est pas capturé par les cellules dendritiques et pourrait donc interférer avec l'endocytose du FVIII par les BM-DC lorsqu'il lui est associé. En effet, une publication récente montre qu'une mutation dans le domaine C1 du FVIII, provoquant une réduction drastique de l'internalisation de la molécule par les CPA humaines et murines, conduit à une forte diminution de la réponse anti-FVIII chez la souris hémophile A [83]. L'origine de l'immunogénicité plus faible du FVIII-PI pourrait donc être liée à une diminution de l'endocytose du FVIII occasionnée par le PI et non à une réduction de la maturation des BM-DC. Afin de valider l'état de maturation effectif des BM-DC en présence de FVIII seul, il faudrait tester l'activation subséquente d'un LT naïf spécifique du FVIII. Gaitonde observe également une différence dans le comportement des BM-DC issues de trois autres lignées murines non hémophiles en réponse au FVIII. En effet, les BM-DC de souris non-hémophiles exprimaient moins de CD40 à leur surface après exposition au FVIII que les BM-DC issues de souris hémophiles. Encore une fois, les différences observées, même si elles sont statistiquement significatives, ne sont pas d'une amplitude telle qu'on puisse escompter un effet biologique majeur. Il serait cependant intéressant de rechercher si les BM-DC des souris hémophiles ont une sensibilité particulière au FVIII, soit en termes de reconnaissance et d'endocytose, soit en termes de stimulation par la molécule. Pour cela, on pourrait reproduire les travaux de Pfistershammer *et al.* qui testait l'activation de MO-DC humaines par le FVIII seul [104] et comparer les résultats avec l'activation de MO-DC issues de patients hémophiles A ayant développé ou non des inhibiteurs. L'absence de FVIII pourrait hypothétiquement entraîner des modifications dans l'organisme des patients, par exemple en réduisant les seuils d'activation menant à la maturation des CPA.

Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une activation directe du système immunitaire par le FVIII qui passerait par sa capacité à induire une maturation des CPA.

Cependant, cela n'exclut pas que le FVIII lié à une autre molécule que le vWF (dont l'association avec le FVIII n'a pas démontré de capacité à induire la maturation des MO-DC [104]) non encore identifiée, puisse favoriser la maturation des CPA ; ou encore qu'une modification quelconque du FVIII dans l'organisme des patients, par exemple une oxydation, puisse rendre la molécule capable d'activer les cellules immunitaires des patients hémophiles A.

III-B.Immunogénicité du FVIII lié au contexte inflammatoire créé par l'absence de FVIII

De nombreuses pathologies présentant des troubles de la coagulation sont caractérisées par un état inflammatoire anormalement élevé, comme l'athérosclérose [192] ou le sepsis [193]. On observe dans la plupart de ces maladies que les plaquettes ont un état d'activation basal anormalement élevé, ou une capacité d'activation augmentée en réponse à un agoniste. Ainsi, deux équipes ont-elles cherché à savoir si, chez les patients hémophiles A, les plaquettes compensaient la faible coagulation par un état de sur-activation basale ou une sensibilité accrue à l'activation [177, 178]. En effet, la sévérité des symptômes, en particulier les fortes hémorragies chez les patients les plus atteints, pourrait être en partie compensée par une sur-activation des plaquettes, comme cela est observée dans les chocs hémorragiques chez la souris [194]. Notre hypothèse était que la chronicité des saignements chez les patients conduirait ainsi à un état d'activation plaquettaire élevé de manière constitutive, créant un environnement inflammatoire propice à l'initiation d'une réponse immunitaire au moment de l'injection du FVIII thérapeutique.

Comme évoqué dans l'introduction (paragraphe I-E.3.), les deux études mentionnées ci-dessus ont montré des résultats contradictoires. Contrairement à l'étude de Grünewald *et al.* van Bladel *et al.* mettaient en évidence une différence entre l'état d'activation des plaquettes

de patients hémophiles sévères et celui des plaquettes de donneurs sains. On note cependant que les cohortes de patients étudiées sont très différentes : l'équipe de Grünewald *et al.* a réalisé son étude sur des patients hémophiles A et B sévères, n'ayant pas développé d'inhibiteurs [178], alors que van Bladel *et al.* ont étudié deux groupes de patients hémophiles A : sévères et mineurs/modérés, sans écarter les patients avec inhibiteurs [177]. Les deux équipes s'intéressaient à une corrélation possible entre la sévérité de la maladie et une potentielle activation compensatoire des plaquettes dans un organisme où la coagulation est fortement perturbée. C'est d'ailleurs ce que montre van Bladel dans son étude puisque le groupe de patients hémophiles A sévères présentent une sur-activation plaquettaire, contrairement au groupe d'hémophiles A mineurs/modérés. Cependant, si l'état de sur-activation des plaquettes est un effet compensatoire face à une coagulation défaillante, alors les patients dont les plaquettes sont plus activées devraient avoir un phénotype hémorragique moins prononcé. Or ce sont précisément les patients hémophiles A sévères, présentant donc les symptômes hémorragiques les plus sérieux, qui possèdent le plus fort pourcentage de plaquettes activées. Notons néanmoins que dans la population hémophile A sévère, définie sur la base d'une activité en FVIII circulant inférieure à 1% de la normale, 10 % des patients présentent un phénotype clinique (saignements) modéré [195]. De tels patients pourraient introduire un biais dans les résultats obtenus dans le groupe d'hémophiles A sévères étudiés. Il est intéressant de constater que l'auteur établit une corrélation entre la consommation de FVIII thérapeutique et l'activation basale des plaquettes : plus les patients ont reçu de FVIII thérapeutique, moins leurs plaquettes sont activées. Cependant, cette consommation élevée de FVIII doit-elle être interprétée comme le reflet de saignements fréquents, traduisant ainsi un phénotype sévère, ou bien le fait de recevoir régulièrement du FVIII permet-il à l'organisme déficient de combler un manque et de se rapprocher d'un fonctionnement hémostatique normal ? La sur-activation des plaquettes chez les patients hémophiles A sévères n'est peut-

être donc pas due à un effet compensatoire des plaquettes, mais pourrait être le reflet d'un état inflammatoire élevé au sein d'organismes dont la cascade de la coagulation est fortement perturbée. Cet état inflammatoire fournirait les signaux de danger nécessaires à l'initiation de la réponse immunitaire contre le FVIII thérapeutique au moment de son injection dans l'organisme.

En effet, contrairement à la gravité des symptômes, la sévérité de la maladie est un facteur de risque avéré dans l'apparition des inhibiteurs du FVIII [196]. Les souris déficientes en FVIII offrent un outil d'investigation idéal dans ce domaine dans la mesure où la sévérité de leurs symptômes hémorragiques est mineure (elles ne présentent pas de saignements massifs spontanés), mais elles développent toute une réponse au FVIII. Ainsi avons-nous comparé l'état d'activation et la capacité à être activées des plaquettes de souris déficientes en FVIII aux plaquettes de souris sauvages. Nous n'avons constaté aucune différence significative entre les deux souches de souris (Article 2). Le modèle murin d'hémophilie A sévère confirme donc les résultats de l'étude de Grünewald, en ne mettant pas en évidence un quelconque état compensatoire des plaquettes lié à la sévérité de la maladie chez les souris hémophiles. L'absence de saignement dans le modèle murin ne nous permet cependant pas de conclure quant aux conséquences de fréquentes hémorragies sur un éventuel état d'activation compensatoire des plaquettes. En revanche, le fait que ces souris développent toute une réponse immunitaire contre le FVIII thérapeutique invalide l'hypothèse qu'un état inflammatoire initial induit par les plaquettes puisse être une source de signal de danger chez la souris. D'autres sources d'inflammation menant à la maturation des CPA peuvent toutefois être envisagées.

En effet, l'interruption presque totale de la cascade de la coagulation pourrait entraîner une accumulation des facteurs de coagulation en amont du FVIII dans la cascade comme le FIXa, ou encore des facteurs non consommés en raison de l'arrêt de la cascade comme le FX ou le

fibrinogène. Ainsi le fibrinogène est-il capable d'activer le TLR4 et de conduire à la sécrétion de chimiokines et cytokines par les macrophages, comme MCP-1, IL-6, IL-8 ou TNF- α [125, 197]. De plus, le fibrinogène est impliqué dans plusieurs maladies avec une forte composante inflammatoire comme l'athérosclérose ou l'arthrite rhumatoïde [198]. La piste des TLR reste donc intéressante, non pas en tant que récepteurs du FVIII mais, plus généralement, en tant que récepteurs de molécules inflammatoires présentes dans un environnement privé de FVIII.

La voie d'activation des TLR passe nécessairement par le recrutement de molécules adaptatrices (Paragraphe I-D.2.2.2.), en particulier la molécule MyD88. Afin d'étudier le rôle des TLR dans la réponse anti-FVIII, j'ai tenté de générer des souris déficientes en FVIII et en MyD88, invalidant ainsi la voie de signalisation de tous les TLR excepté le TLR3, et une partie de la voie de signalisation du TLR4 [115]. Cependant, malgré l'obtention d'un nombre normal de souriceaux par portée, aucun n'était homozygote pour l'invalidation du gène codant le FVIII et du gène codant MyD88. Cette observation suggère que la double invalidation affecte le développement embryonnaire des souris, uniquement lorsque MyD88 est invalidé de manière homozygote, puisque des souris déficientes en FVIII et hétérozygotes pour MyD88 étaient obtenues. Ceci souligne encore une fois, et de manière indirecte, le lien ténu qui existe entre inflammation et coagulation, et suggère un lien possible entre TLR, coagulation et développement embryonnaire, qui reste à explorer.

L'importance du contrôle de l'environnement inflammatoire avant l'injection de FVIII est soulignée par le travail de Kurnik *et al.* mentionné dans l'introduction (Paragraphe I-D.3.1). En effet, cette étude pilote réalisée sur un groupe de patients hémophiles A sévères suggère que l'injection de FVIII thérapeutique dans un contexte qui évite au maximum les situations inflammatoires telles que les saignements, les infections, ou les vaccinations, diminue le risque d'alloimmunisation contre la protéine [116]. Ces résultats sont controversés mais l'équipe a récemment publié une suite, indiquant que le traitement était toujours efficace dans

la prévention du développement d'inhibiteurs chez les patients, après plus de 150 jours d'exposition au FVIII (seul un patient sur 26 avait développé des inhibiteurs). De plus, une nouvelle étude a été initiée avec un nouveau groupe de 14 patients dont certains sont à fort risque de développement d'inhibiteurs, en raison de la nature de la mutation ou de l'histoire familiale de ce type de complication et, après 40 jours d'exposition au FVIII, aucun n'avait développé d'inhibiteurs [199]. Pour rappel, les patients hémophiles A sévères présentent un risque maximum d'apparition d'un inhibiteur au cours des 100-150 premiers jours cumulés d'exposition au FVIII thérapeutique.

En ligne avec cette étude, nous avons cherché à réduire le contexte inflammatoire des souris hémophiles A, en induisant la production d'hème oxygénase-1 (HO-1) avant l'injection de FVIII (Paragraphe I-D.3.1). De cette façon, nous sommes parvenus à réduire fortement l'immunogénicité du FVIII chez les souris traitées (ANNEXES, Article 1). En physiologie, l'expression d'HO-1 est induite, entre autre, par l'hème. L'hème est alors hydrolysé par l'HO-1, ce qui conduit à la libération de fer libre et à la formation de biliverdine et de monoxyde de carbone (CO). Les deux dernières molécules possèdent des propriétés anti-inflammatoires extrêmement puissantes [200]. Les hémorragies représentent une source d'hème libre importante et, par conséquent, une source d'induction d'HO-1. Cependant, les saignements sont également une source importante d'inflammation, en particulier par la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) dont les propriétés fortement oxydatives et l'implication dans les réponses immunitaires ont été largement décrites [201]. Les hémorragies constituent donc à la fois une source d'inflammation et de régulation de l'inflammation, dans un équilibre finement régulé. En injectant un analogue de l'hème chez les souris hémophiles, nous avons probablement fait pencher la balance en faveur d'un environnement anti-inflammatoire qui n'est pas spontané chez les souris hémophiles A. De plus, ces souris ne saignent pas spontanément ce qui suggère que, dans ce modèle, la balance

inflammatoire n'est pas dépendante des hémorragies. La diminution de l'expression du CMH II observée à la surface des CPA des souris traitées et la réduction subséquente de la prolifération des LT [120] apportent une explication quant à la réduction drastique de la réponse immunitaire contre le FVIII après injection de la molécule.

Les informations croisées entre les patients et le modèle murin d'hémophilie A ne sont pas en faveur d'un environnement inflammatoire initial favorable à l'apparition d'une réponse contre le FVIII thérapeutique au moment de son injection. Une autre piste est à explorer : les évènements consécutifs à l'administration d'une molécule active au fort pouvoir pro-coagulant dans un organisme à l'hémostase perturbée.

III-C.Immunogénicité liée au contexte inflammatoire créé par l'injection de FVIII

L'injection de FVIII dans un organisme hémophile A conduit à une restauration soudaine de la coagulation. Dans ce contexte, les facteurs de la coagulation en aval du FVIII dans la cascade de la coagulation comme le FXa, la thrombine ou la fibrine sont alors soudainement et massivement générés. Les récents travaux de Skupsky *et al.* ont montré une réduction de l'immunogénicité du FVIII chez les souris hémophiles lorsque le FVIII était injecté avec de la warfarine, un inhibiteur de la vitamine K qui bloque la synthèse de la prothrombine, du FVII, du FIX et du FX [202]. De même, l'hirudine, un inhibiteur spécifique de la thrombine montrait un effet similaire sur l'immunogénicité du FVIII [127]. Cette étude suggérait un rôle de la thrombine dans l'initiation de la réponse anti-FVIII chez la souris hémophilie A. Par ailleurs, l'injection d'une faible dose d'ovalbumine (OVA) en présence de thrombine chez des souris sauvages conduisait à l'apparition d'une réponse immunitaire contre l'OVA ; cette réponse n'était pas observée lorsque l'OVA était injectée seule. La thrombine semble donc posséder les propriétés d'un adjuvant immunologique, c'est-à-dire qu'elle participe à créer le contexte permettant l'initiation de réponses immunitaires contre certains antigènes.

L'initiation d'une réponse immunitaire contre un antigène comprend sa reconnaissance et son endocytose par les CPA, la maturation des CPA et la présentation des peptides dérivés de la protéine aux LT dans le contexte du CMH. L'étape à laquelle la thrombine intervient en temps qu'adjuvant reste à déchiffrer. Est-ce une action directe de la thrombine en tant qu'activateur du système immunitaire ou n'est-elle qu'un intermédiaire qui conduit à la production ou la sécrétion de molécules elles-mêmes adjuvantes ?

Parallèlement à ce travail, et partant des mêmes constatations que Supsky concernant l'explosion de génération de FXa et de thrombine, nous avons entrepris l'étude du rôle des récepteurs PAR dans la réponse anti-FVIII. En effet, les PAR sont des récepteurs dont l'activation, de nature irréversible, se fait par clivage enzymatique. Ce clivage expose une nouvelle partie du récepteur, un « ligand ancré », capable de se lier de façon intramoléculaire à une région spécifique et conduisant à l'activation du récepteur [203]. Les PAR sont exprimés à la surface de nombreuses cellules, en particulier les plaquettes et les cellules endothéliales, qui sont des acteurs clefs de la coagulation. Parmi les agonistes de ces récepteurs, on trouve le FXa, agoniste des PAR1 et 2 [180], et la thrombine qui active les PAR1, 3 et 4 [181]. Comme évoqué précédemment, la génération de thrombine chez le patient hémophile A est fortement dépendante de l'administration de FVIII, il est donc logique d'imaginer que l'explosion de génération de thrombine consécutive à l'introduction du FVIII exogène chez le patient hémophile A puisse stimuler les PAR1, 3 et 4.

Ainsi avons-nous testé l'implication des PAR dans la réponse anti-FVIII en administrant des antagonistes des récepteurs PAR 1, PAR2 et PAR4 (à notre connaissance, aucun antagoniste de PAR3 n'est disponible) à des souris hémophiles A juste avant l'injection de FVIII. Nous avons observé que l'inhibition des PAR entraînait une réduction de la réponse d'IgG anti-FVIII chez les souris traitées en comparaison avec des souris ayant reçu du FVIII seul (Article 3). Les récepteurs PAR étant exprimés entre-autres à la surface des plaquettes (PAR3 et

PAR4 uniquement chez la souris [204]) et des cellules endothéliales (au moins PAR1, 2 et 4 chez la souris [205, 206]), il n'est pas facile, dans nos expériences, d'apprécier l'importance relative des PAR cellulaires et des PAR plaquettaires dans l'activation de la réponse anti-FVIII. Il est vraisemblable que dans nos expériences, nous ayons bloqué l'activation des PAR par le FXa et la thrombine à la surface des cellules endothéliales (figure 9A). Les plaquettes murines, quant à elles, ne sont pas activées par le FXa puisqu'elles n'expriment ni PAR1, ni PAR2. En revanche, la thrombine, qui est l'activateur le plus efficace des plaquettes perd totalement cette fonction dans notre expérience (Figure 10A) puisque, PAR3 n'étant pas capable d'induire seul un signal d'activation en réponse à la thrombine [207], l'inhibition de PAR4 suffit à bloquer la voie d'activation des plaquettes murines par la thrombine. Il aurait été intéressant de confirmer l'implication de l'une ou l'autre des protéases par l'administration des inhibiteurs de PAR1 et PAR2, qui auraient bloqué la signalisation du FXa seul (Figure 10B). De plus, l'utilisation seule de l'antagoniste de PAR4 nous aurait permis d'explorer si le rôle de la thrombine dans la réponse anti-FVIII passe par les plaquettes (figure 10C).

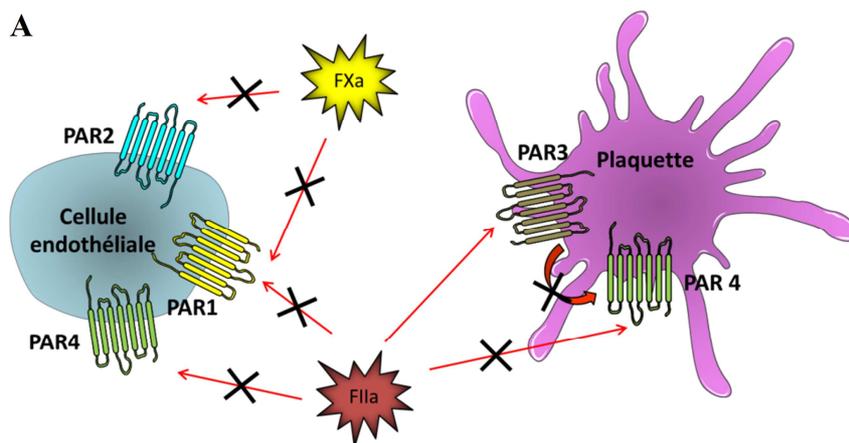


Figure 10A. Inhibition des PAR1, 2 et 4 chez les souris : blocage de l'activation des plaquettes et des cellules endothéliales par le FXa et la thrombine (FIIa).

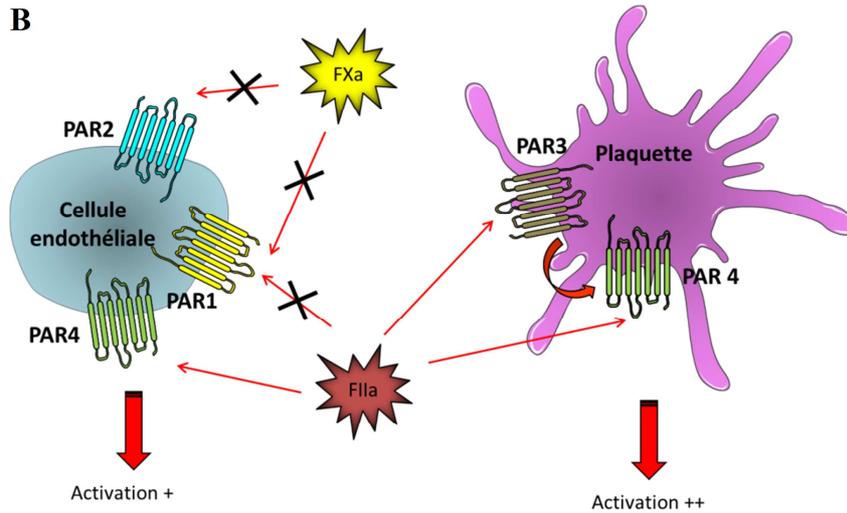


Figure 10B. Inhibition des PAR1 et 2 chez la souris : blocage de l'activation des cellules endothéliales par le FXa

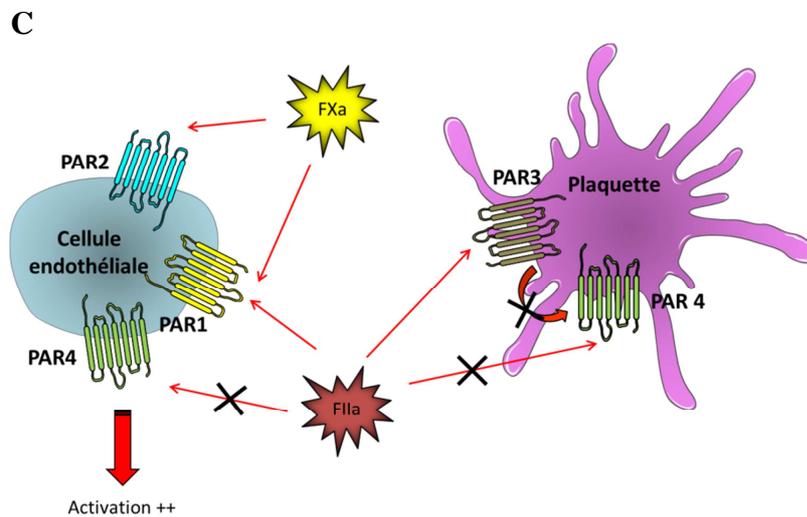


Figure 10C. Inhibition de PAR4 : blocage de l'activation des plaquettes par la thrombine.

Figure 10. Conséquences présumées de l'inhibition sélective des PAR

Etant donné 1) le peu d'outils à notre disposition pour approfondir *in vitro* le rôle des PAR dans la réponse anti-FVIII, 2) les résultats de l'étude de Skupsky sur l'importance de la thrombine et 3) l'importance de la thrombine dans l'activation plaquettaire par la voie de signalisation des PAR, nous avons décidé d'explorer la piste d'un rôle des plaquettes dans la réponse immunitaire. En effet, une étude réalisée par Elzey *et al.* montrait que des souris sauvages injectées avec une forte dose d'OVA développaient une réponse IgG anti-OVA, ce qui n'était plus le cas lorsque ces souris étaient préalablement dépourvues de leurs plaquettes

[182]. On note que, dans ce dernier article, et contrairement à ce qui est décrit dans l'article de Skupsky, l'OVA était capable d'induire une réponse immunitaire chez la souris sauvage. Bien que la voie d'administration soit identique dans les deux études, la voie intrapéritonéale, les quantités injectées étaient très différentes. Skupsky injectait 1 µg d'OVA une fois par semaine pendant 5 semaines alors qu'Elzey administrait 200 µg d'OVA en une seule fois. En effet, une protéine faiblement immunogène peut ne pas déclencher de réponse immunitaire injectée seule et à faible dose, en revanche au-delà d'un certain seuil, l'activation du système immunitaire est inévitable. Ainsi les plaquettes semblent-elles impliquées dans l'initiation de certaines réponses immunitaires contre des protéines exogènes.

De la même façon, nous avons testé le rôle des plaquettes dans la réponse immunitaire contre le FVIII thérapeutique chez la souris hémophile A. Nous avons observé chez ces souris, que la déplétion des plaquettes avant l'injection de FVIII exogène réduit de façon drastique l'apparition d'une réponse immunitaire contre le FVIII, que le FVIII soit administré à faibles doses de façon répétée, ou à forte dose en une seule injection (Article 3). Ainsi, quelle que soit la quantité de FVIII injecté, les plaquettes participent-elles à l'élaboration d'une réponse immunitaire contre la protéine. Nous avons également cherché à déchiffrer le mécanisme par lequel les plaquettes pouvaient intervenir dans la réponse anti-FVIII, en particulier si cela dépendait de l'activation des plaquettes consécutive à l'administration de FVIII, comme le suggéraient nos résultats obtenus après l'inhibition des PAR, ou d'un éventuel transport du FVIII vers la rate, organe fortement impliqué dans la réponse anti-FVIII chez la souris [74]. En effet, si la liaison du FVIII activé aux plaquettes activées n'est plus à démontrée, cette interaction privilégiée favorise-t-elle le transport du FVIII dans la rate, où se trouve près d'un tiers des plaquettes de l'organisme ? Rappelons qu'une publication récente décrit un rôle des plaquettes dans le transport de certains pathogènes dans la rate [175], et son importance pour l'activation d'une réponse immunitaire protectrice.

L'étude des rates de souris hémophiles A déplétées en plaquettes avant l'injection de FVIII exogène, n'a pas mis en évidence de différence dans l'accumulation du FVIII au niveau des macrophages métallophiliques de la zone marginale de la rate, en comparaison aux souris contrôles. Le mécanisme par lequel les plaquettes influent sur le développement de la réponse anti-FVIII n'est donc probablement pas le transport du FVIII vers le site d'initiation de la réponse immunitaire. En conditions physiologiques, les plaquettes sont présentes en grand nombre dans la rate. Chez la souris hémophile, l'élimination de ces cellules pourrait modifier l'organisation complexe de cet organe, et, pour cette simple raison, perturber l'apparition de la réponse anti-FVIII. Cependant, l'analyse des coupes histologiques des rates de souris dont les plaquettes ont été éliminées, n'a révélé aucune modification structurelle évidente. Cette observation confirme le rôle intrinsèque des plaquettes dans l'initiation de la réponse anti-FVIII en excluant l'hypothèse que la disparition des plaquettes de l'organisme puisse endommager l'intégrité de la rate, et perturber la réponse immunitaire. En revanche, cette constatation ne nous permet pas de favoriser l'implication des plaquettes circulantes plutôt que spléniques dans la réponse anti-FVIII. Elle ne nous permet également pas d'extrapoler le site de rencontre possible entre plaquettes, FVIII et CPA.

En effet, la découverte du site de rencontre entre ces trois protagonistes est une étape cruciale dans le déchiffrement de l'initiation de la réponse anti-FVIII. Deux sites de rencontre sont possibles : le site de coagulation et la rate. Des analyses d'immunohistochimie sur des coupes de rates de souris hémophiles A traitées au FVIII permettraient de rechercher une co-localisation potentielle des plaquettes avec le FVIII et les CPA. Le FVIII s'accumule dans la zone marginale de la rate [74], alors que les plaquettes résident plutôt dans la pulpe rouge. Néanmoins, cela n'exclut pas une interaction à la frontière des deux zones entre CPA, FVIII et plaquettes, ou encore un dialogue par l'intermédiaire de molécules sécrétées. Par ailleurs, nous envisageons de débiter une collaboration avec le Dr C. Dubois à Marseille, afin de

rechercher *in vivo* l'accumulation de CPA au niveau de blessures vasculaires induites au laser, à l'aide d'un système d'imagerie intra-vitale.

Les résultats que nous avons obtenus suite à l'inhibition des récepteurs PAR chez la souris hémophile suggèrent que le rôle des plaquettes dans la réponse anti-FVIII est dépendant de leur activation par la thrombine. Nous avons néanmoins voulu tester si d'autres voies importantes de l'activation des plaquettes pouvaient être impliquées dans le développement de la réponse immunitaire contre le FVIII exogène. Il existe deux récepteurs à l'ADP à la surface des plaquettes : P_2Y_2 et P_2Y_{12} . La fonctionnalité des deux récepteurs est nécessaire à une activation plaquettaire normale [208]. Ainsi, en inhibant le récepteur P_2Y_{12} avons-nous cherché à bloquer la voie d'activation des plaquettes par l'ADP. Pour cela, des souris hémophiles ont été traitées avec du clopidogrel, un inhibiteur spécifique de P_2Y_{12} , une semaine avant de recevoir le traitement chronique de FVIII et durant toute la durée du traitement. Nous avons confirmé l'inhibition de la voie d'activation des plaquettes par l'ADP en montrant que les plaquettes de souris traitées au clopidogrel depuis une semaine, c'est-à-dire avant la première injection de FVIII, ainsi que les plaquettes de souris traitées pendant 5 semaines, n'étaient plus activées par l'ADP. Contrairement aux souris traitées avec les inhibiteurs de PAR, l'inhibition de la voie d'activation des plaquettes dépendante de l'ADP n'a montré aucun effet sur l'apparition de la réponse anti-FVIII. Cette expérience conforte l'idée que l'implication des plaquettes dans la réponse immunitaire contre le FVIII implique, au moins en partie, leur activation par la thrombine.

Certaines données de la littérature permettent d'imaginer des voies de recherche futures dans le but de caractériser le rôle des plaquettes dans la réponse immunitaire contre le FVIII thérapeutique. En effet, les travaux d'Elzey et d'autres équipes montrent que le rôle des plaquettes dans l'inflammation et l'immunité est fortement lié à la molécule CD154 (ou CD40L) plaquettaire [182]. Le CD154, principalement exprimé à la surface des LT, est le

ligand de CD40, exprimé entre-autre à la surface des CPA et des LB. L'engagement du CD154 à la surface des LT avec le CD40 des LB participe à l'activation des LB qui conduit à la réponse humorale [209]. En plus d'exprimer le CD154 à leur surface, les plaquettes sécrètent une forme soluble et active du CD154 (sCD154) ; elles sont ainsi à l'origine de 95 % du sCD154 circulant dans l'organisme [157]. Or, des travaux antérieurs ont montré que l'utilisation d'anticorps monoclonaux qui bloquent le CD154 prévient ou élimine la réponse anti-FVIII tant chez les souris hémophiles A [210-212] que chez les patients [213]. Dans ces études, les effets du traitement avec les anticorps anti-CD154 avaient été attribués à la perturbation du dialogue entre les CPA et les LT. Cependant, à la lumière de nos travaux, les effets observés pourraient également être attribués à la neutralisation du sCD154 plaquettaire. Le sCD154 constitue à lui seul un signal de danger puisqu'il a la capacité d'activer directement les MO-DC [214]. Ainsi serait-il intéressant de rechercher l'implication du sCD154 plaquettaire dans l'initiation de la réponse anti-FVIII, par exemple, en étudiant la réponse anti-FVIII chez la souris hémophile A après déplétion des plaquettes puis reconstitution avec des plaquettes de souris déficientes en CD154.

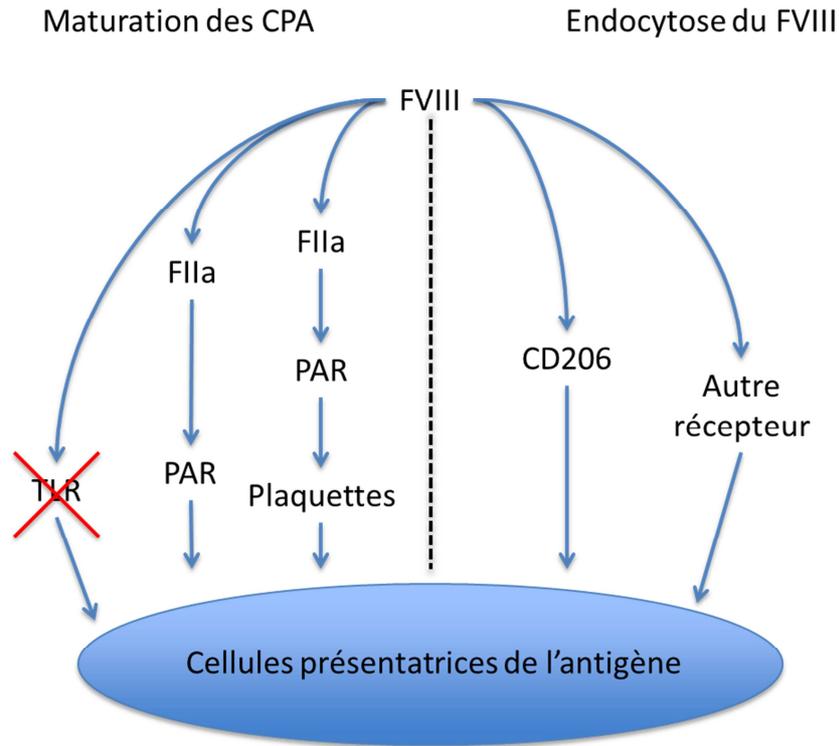


Figure 11. Résumé des hypothèses suggérées par les résultats présentés. Après injection, le FVIII est endocyté par le CD206 ou d'autres récepteurs conduisant à la présentation de peptides dérivés du FVIII sur le CMH II. Le signal de danger responsable de la maturation des CPA chez les souris hémophiles ne fait pas intervenir une activation directe des TLR par le FVIII mais passe par la thrombine, les récepteurs PAR et les plaquettes.

IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'immunogénicité du FVIII thérapeutique chez les patients hémophiles A fait l'objet de recherches intensives depuis plusieurs dizaines d'années. Cette complication majeure affecte le traitement et la qualité de vie des patients. Les acteurs de la phase effectrice de la réponse immunitaire anti-FVIII : les anticorps, les LB et les LT CD4⁺, ont suscité un grand intérêt. Pour autant, à l'exception de la stratégie thérapeutique de l'induction de tolérance immunitaire (ITI), cibler la phase effectrice de la réponse contre le FVIII exogène, par exemple en administrant des anticorps thérapeutiques anti-CD20 [215-218] ou anti-CD3 [219], s'est révélé décevant, tant chez l'Homme que dans les modèles animaux.

Les étapes d'initiation de la réponse anti-FVIII sont beaucoup moins connues et suscitent un intérêt croissant, en particulier la recherche des récepteurs d'endocytose du FVIII [77, 81, 82, 220-223]. Une autre étape cruciale dans cette phase d'initiation est la maturation des CPA ayant endocyté le FVIII, qui résulte de la perception de signaux de danger présents dans l'environnement des cellules. L'origine et la nature de ces signaux de danger est inconnue.

Au début de mes travaux de thèse, le champ d'investigation était très vaste puisque les seules études réalisées, y compris par notre équipe, concernant les signaux de danger dans la réponse anti-FVIII concernaient l'étude de l'activation directe des MO-DC par le FVIII [104]. J'ai donc souhaité explorer trois origines possibles : le FVIII lui-même, le contexte inflammatoire des organismes hémophiles avant l'injection de FVIII, et après l'injection de FVIII exogène, au travers de l'étude du potentiel adjuvant de certaines portions du FVIII, des TLR et des PAR. Mes résultats préliminaires, et l'intégration de nouvelles informations issues de publications contemporaines à ma thèse, m'ont poussée à redéfinir une partie de mes recherches et à affiner mes cibles. Ainsi, les travaux de thèse d'Amith m'ont encouragée à privilégier l'étude du TLR2 [179], et les travaux de Skupsky, à creuser la piste des plaquettes [127]. A l'issue de ma thèse, j'ai démontré que le FVIII tel qu'il est injecté, n'est pas capable

d'induire la maturation des macrophages murins ou d'activer directement le TLR2, sans écarter la piste d'une modification ou d'une liaison *in vivo* de la protéine pouvant lui conférer cette capacité (Article 1). J'ai également écarté la piste d'un état d'activation compensatoire des plaquettes dans un organisme privé de FVIII, pouvant induire un environnement inflammatoire propice à l'initiation de la réponse anti-FVIII (Article 2). Cela n'exclut pas l'implication d'autres composants pro-inflammatoires potentiellement favorisés par l'absence de FVIII. En revanche, j'ai mis en évidence un rôle des plaquettes dans l'initiation du FVIII thérapeutique dans le modèle murin d'hémophilie A, au moment de l'injection de la molécule, probablement par l'intermédiaire de la thrombine générée en masse lors de l'administration du FVIII, qui active les plaquettes après stimulation des PAR (Article 3).

L'importance du rôle adjuvant des plaquettes mis en évidence dans ces travaux n'ouvre pas pour autant de perspectives thérapeutiques directes, par exemple par un ciblage direct des plaquettes chez les patients au moment de l'injection du FVIII thérapeutique. En effet, quel intérêt pourrait-il y avoir à rétablir une coagulation défaillante chez les patients hémophiles A si c'est pour stopper cet effet deux étapes plus loin ? En revanche, l'identification des médiateurs de l'inflammation issus de l'activation des plaquettes devrait ouvrir des perspectives thérapeutiques intéressantes dans le contrôle de l'inflammation au moment de l'administration de FVIII. En effet, la balance pro-inflammatoire/anti-inflammatoire est finement régulée et la réponse immunitaire anti-FVIII observée chez certains patients est probablement le résultat d'un excès d'inflammation non régulée au moment de l'injection de FVIII exogène.

Certains facteurs environnementaux sont probablement impliqués dans la balance inflammatoire et peuvent être déterminants dans l'initiation de la réponse contre le FVIII exogène. D'ailleurs, l'étude clinique de Kurnik sur la réduction des situations inflammatoires

au moment de l'injection de FVII thérapeutique [116] apporte des éléments en faveur de cette hypothèse.

Certains facteurs génétiques ont également déjà évoqués comme des polymorphismes dans les promoteurs des gènes codant pour certaines cytokines comme le TNF- α , plutôt pro-inflammatoire et dont l'expression est favorisée chez les patients avec inhibiteurs [54], et l'IL-10, plutôt anti-inflammatoire mais dont la mutation en question est associée à différentes maladies autoimmunes [55]. Notre équipe va bientôt enrichir cette liste avec une prochaine publication concernant un polymorphisme dans le promoteur d'HO-1, molécule anti-inflammatoire dont nous avons montré l'efficacité dans le contrôle de l'immunogénicité du FVIII en cas de surexpression [120] au moment de l'administration du FVIII chez les souris hémophiles, et dont les capacités d'expression semblent réduites chez les patients hémophiles A sévères avec inhibiteurs.

L'environnement cytokinique est primordial car l'intégration de tous les signaux environnants détermine l'induction de la maturation des CPA, et les plaquettes pourraient y participer car leur activation conduit à la sécrétion d'un grand nombre de cytokines, comme l'IL-1 β , et de chimiokines, comme RANTES ou PF-4 [183], capables d'attirer les leucocytes qui viendront alimenter le milieu en médiateurs pro-inflammatoires. De plus, le sCD154 plaquettaire au fort pouvoir pro-inflammatoire pourrait jouer le rôle de signal de danger lorsqu'il est massivement sécrété par les plaquettes activées et représenter une nouvelle cible thérapeutique.

V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Lenting, P.J., J.A. van Mourik, and K. Mertens, *The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function*. Blood, 1998. **92**(11): p. 3983-96.
2. Hoyer, L.W., *Hemophilia A*. N Engl J Med, 1994. **330**(1): p. 38-47.
3. Daniele, F., V. Rossi, and C. Santoro, *Effective management of intracranial haemorrhage with continuous infusion of highly purified von Willebrand factor/factor VIII complex concentrate in an adult with severe haemophilia A*. Blood Transfus, 2011. **9**(4): p. 472-4.
4. Antonarakis, S.E., et al., *Molecular etiology of factor VIII deficiency in hemophilia A*. Adv Exp Med Biol, 1995. **386**: p. 19-34.
5. Ingram, G.I., *The history of haemophilia*. J Clin Pathol, 1976. **29**(6): p. 469-79.
6. Otto, J.C., *An account of an haemorrhagic disposition existing in certain families*. Med. Repos., 1828. **VI**: p. 1-4.
7. Hopff, F., *Über die Hämophilie oder die erbliche Anlage zu tödlichen Blutungen*. 1828, Univ. Zurich.
8. Pool, J.G., E.J. Gershgold, and A.R. Pappenhagen, *High-Potency Antihemophilic Factor Concentrate Prepared from Cryoglobulin Precipitate*. Nature, 1964. **203**: p. 312.
9. Gitschier, J., et al., *Characterization of the human factor VIII gene*. Nature, 1984. **312**(5992): p. 326-30.
10. Oldenburg, J. and O. El-Maarri, *New insight into the molecular basis of hemophilia A*. Int J Hematol, 2006. **83**(2): p. 96-102.
11. Zhang, B., et al., *Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex*. Nat Genet, 2003. **34**(2): p. 220-5.
12. Bhopale, G.M. and R.K. Nanda, *Blood coagulation factor VIII: An overview*. J Biosci, 2003. **28**(6): p. 783-9.
13. Oldenburg, J., et al., *Small deletion/insertion mutations within poly-A runs of the factor VIII gene mitigate the severe haemophilia A phenotype*. Thromb Haemost, 1998. **79**(2): p. 452-3.
14. Lakich, D., et al., *Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A*. Nat Genet, 1993. **5**(3): p. 236-41.
15. Amano, K., et al., *The molecular basis for cross-reacting material-positive hemophilia A due to missense mutations within the A2-domain of factor VIII*. Blood, 1998. **91**(2): p. 538-48.
16. Yadav, N., et al., *Factor VIII can be synthesized in hemophilia A mice liver by bone marrow progenitor cell-derived hepatocytes and sinusoidal endothelial cells*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(1): p. 110-20.
17. Vehar, G.A., et al., *Structure of human factor VIII*. Nature, 1984. **312**(5992): p. 337-42.
18. Wood, W.I., et al., *Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones*. Nature, 1984. **312**(5992): p. 330-7.
19. Kaufman, R.J., et al., *Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1997. **8 Suppl 2**: p. S3-14.
20. Rosenberg, J.B., et al., *Intracellular trafficking of factor VIII to von Willebrand factor storage granules*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 613-24.
21. Broos, K., et al., *Platelets at work in primary hemostasis*. Blood Rev, 2011. **25**(4): p. 155-67.
22. Norris, L.A., *Blood coagulation*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2003. **17**(3): p. 369-83.

23. Davie, E.W., K. Fujikawa, and W. Kisiel, *The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation*. Biochemistry, 1991. **30**(43): p. 10363-70.
24. Ovlisen, K., A.T. Kristensen, and M. Tranholm, *In vivo models of haemophilia - status on current knowledge of clinical phenotypes and therapeutic interventions*. Haemophilia, 2008. **14**(2): p. 248-59.
25. Field, R.A., C.G. Rickard, and F.B. Hutt, *Hemophilia in a family of dogs*. Cornell Vet, 1946. **36**(4): p. 285-300.
26. Graham, J.B., J.A. Buckwalter, and et al., *Canine hemophilia; observations on the course, the clotting anomaly, and the effect of blood transfusions*. J Exp Med, 1949. **90**(2): p. 97-111.
27. Bi, L., et al., *Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A*. Nat Genet, 1995. **10**(1): p. 119-21.
28. Bi, L., et al., *Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3446-50.
29. Sabatino, D.E., et al., *Animal models of hemophilia*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **105**: p. 151-209.
30. Mauser-Bunschoten, E.P., D.E. Fransen Van De Putte, and R.E. Schutgens, *Comorbidity in the ageing haemophilia patient: the down side of increased life expectancy*. Haemophilia, 2009. **15**(4): p. 853-63.
31. Rodriguez-Merchan, E.C., et al., *Joint protection in haemophilia*. Haemophilia, 2011. **17 Suppl 2**: p. 1-23.
32. Viel, K.R., et al., *Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia*. N Engl J Med, 2009. **360**(16): p. 1618-27.
33. Bjorkman, S., A. Folkesson, and S. Jonsson, *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, 2009. **65**(10): p. 989-98.
34. Johnston, A., *The relevance of factor VIII (FVIII) pharmacokinetics to TDM and hemophilia a treatment: is B domain-deleted FVIII equivalent to full-length FVIII?* Ther Drug Monit, 2012. **34**(1): p. 110-7.
35. Mehta, R., R. Parameswaran, and A.D. Shapiro, *An overview of the history, clinical practice concerns, comparative studies and strategies to optimize therapy of bypassing agents*. Haemophilia, 2006. **12 Suppl 6**: p. 54-61.
36. Oldenburg, J. and A. Pavlova, *Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX*. Haemophilia, 2006. **12 Suppl 6**: p. 15-22.
37. Gringeri, A., et al., *Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2358-63.
38. Verbruggen, B., et al., *The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability*. Thromb Haemost, 1995. **73**(2): p. 247-51.
39. Fulcher, C.A., S. de Graaf Mahoney, and T.S. Zimmerman, *FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting*. Blood, 1987. **69**(5): p. 1475-80.
40. Aalberse, R.C., et al., *IgG4 as a blocking antibody*. Clin Rev Allergy, 1983. **1**(2): p. 289-302.
41. Lubahn, B.C., et al., *Identification of a F.VIII epitope recognized by a human hemophilic inhibitor*. Blood, 1989. **73**(2): p. 497-9.
42. Zhong, D., et al., *Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX*. Blood, 1998. **92**(1): p. 136-42.

43. Arai, M., D. Scandella, and L.W. Hoyer, *Molecular basis of factor VIII inhibition by human antibodies. Antibodies that bind to the factor VIII light chain prevent the interaction of factor VIII with phospholipid.* J Clin Invest, 1989. **83**(6): p. 1978-84.
44. Shima, M., et al., *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, 1993. **69**(3): p. 240-6.
45. Saenko, E.L., et al., *Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition.* J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27424-31.
46. Lacroix-Desmazes, S., et al., *Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A.* Nat Med, 1999. **5**(9): p. 1044-7.
47. Lacroix-Desmazes, S., et al., *The prevalence of proteolytic antibodies against factor VIII in hemophilia A.* N Engl J Med, 2002. **346**(9): p. 662-7.
48. Qian, J., et al., *Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A.* Thromb Haemost, 1999. **81**(2): p. 240-4.
49. Healey, J.F., et al., *The humoral response to human factor VIII in hemophilia A mice.* J Thromb Haemost, 2007. **5**(3): p. 512-9.
50. Astermark, J., *Why do inhibitors develop? Principles of and factors influencing the risk for inhibitor development in haemophilia.* Haemophilia, 2006. **12 Suppl 3**: p. 52-60.
51. Hay, C.R., *The epidemiology of factor VIII inhibitors.* Haemophilia, 2006. **12 Suppl 6**: p. 23-8; discussion 28-9.
52. Oldenburg, J., et al., *HLA genotype of patients with severe haemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII.* Thromb Haemost, 1997. **77**(2): p. 238-42.
53. Moise, L., et al., *Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo.* Clin Immunol, 2012. **142**(3): p. 320-31.
54. Astermark, J., et al., *Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A.* Blood, 2006. **108**(12): p. 3739-45.
55. Astermark, J., et al., *Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A.* Blood, 2006. **107**(8): p. 3167-72.
56. Astermark, J., et al., *Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A.* J Thromb Haemost, 2007. **5**(2): p. 263-5.
57. Aledort, L.M. and D.M. Dimichele, *Inhibitors occur more frequently in African-American and Latino haemophiliacs.* Haemophilia, 1998. **4**(1): p. 68.
58. Delignat, S., et al., *Immunoprotective effect of von Willebrand factor towards therapeutic factor VIII in experimental haemophilia A.* Haemophilia, 2012. **18**(2): p. 248-54.
59. Lusher, J.M., et al., *Recombinant factor VIII for the treatment of previously untreated patients with hemophilia A. Safety, efficacy, and development of inhibitors. Kogenate Previously Untreated Patient Study Group.* N Engl J Med, 1993. **328**(7): p. 453-9.
60. Bray, G.L., et al., *A multicenter study of recombinant factor VIII (recombinate): safety, efficacy, and inhibitor risk in previously untreated patients with hemophilia A. The Recombinate Study Group.* Blood, 1994. **83**(9): p. 2428-35.
61. Lusher, J.M., *Is the incidence and prevalence of inhibitors greater with recombinant products? No.* J Thromb Haemost, 2004. **2**(6): p. 863-5.

62. Goudemand, J., et al., *Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A*. Blood, 2006. **107**(1): p. 46-51.
63. Gouw, S.C., J.G. van der Bom, and H. Marijke van den Berg, *Treatment-related risk factors of inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: the CANAL cohort study*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4648-54.
64. Lorenzo, J.I., et al., *Incidence of factor VIII inhibitors in severe haemophilia: the importance of patient age*. Br J Haematol, 2001. **113**(3): p. 600-3.
65. van der Bom, J.G., et al., *Age at first treatment and immune tolerance to factor VIII in severe hemophilia*. Thromb Haemost, 2003. **89**(3): p. 475-9.
66. Gouw, S.C., et al., *Treatment characteristics and the risk of inhibitor development: a multicenter cohort study among previously untreated patients with severe hemophilia A*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(7): p. 1383-90.
67. van den Berg, H.M., et al., *Inhibitor development in a multitransfused patient with severe haemophilia A*. Thromb Haemost, 1999. **82**(1): p. 151-2.
68. Koestenberger, M., W. Raith, and W. Muntean, *High titre inhibitor after continuous factor VIII administration for surgery in a young infant*. Haemophilia, 2000. **6**(2): p. 120.
69. Koestenberger, M., B. Leschnik, and W. Muntean, *More on: mild hemophilia A and inhibitor development*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(4): p. 676; author reply 677.
70. Lacroix-Desmazes, S., et al., *Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A*. Blood, 2008. **112**(2): p. 240-9.
71. De Groot, A.S. and D.W. Scott, *Immunogenicity of protein therapeutics*. Trends Immunol, 2007. **28**(11): p. 482-90.
72. Brown, J.E., C.L. Carton, and C. Hougie, *The effect of naturally occurring antibodies to factor VIII on an immunoradiometric assay for factor VIII coagulant antigen. Observation on a cross-reacting material-positive (CRM+) hemophiliac with a factor VIII inhibit*. J Lab Clin Med, 1981. **97**(1): p. 65-71.
73. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 901-44.
74. Navarrete, A., et al., *Splenic marginal zone antigen-presenting cells are critical for the primary allo-immune response to therapeutic factor VIII in hemophilia A*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(11): p. 1816-23.
75. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.
76. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
77. Dasgupta, S., et al., *A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8965-70.
78. Nolte, M.A., et al., *Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments*. Eur J Immunol, 2000. **30**(2): p. 626-34.
79. Mebius, R.E. and G. Kraal, *Structure and function of the spleen*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 606-16.
80. Manco-Johnson, M.J., et al., *Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia*. N Engl J Med, 2007. **357**(6): p. 535-44.
81. Saenko, E.L., et al., *Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37685-92.

82. Bovenschen, N., et al., *The B domain of coagulation factor VIII interacts with the asialoglycoprotein receptor*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(6): p. 1257-65.
83. Herczenik, E., et al., *Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(2): p. 501-9, 509 e1-5.
84. Vos, Q., et al., *B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 154-70.
85. van den Brink, E.N., et al., *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, 2000. **96**(2): p. 540-5.
86. Leyva, W.H., A.P. Knutsen, and J.H. Joist, *Disappearance of a high response factor VIII inhibitor in a hemophiliac with AIDS*. Am J Clin Pathol, 1988. **89**(3): p. 414-8.
87. Ragni, M.V., F.A. Bontempo, and J.H. Lewis, *Disappearance of inhibitor to factor VIII in HIV-infected hemophiliacs with progression to AIDS or severe ARC*. Transfusion, 1989. **29**(5): p. 447-9.
88. Misra, N., et al., *Restricted BV gene usage by factor VIII-reactive CD4+ T cells in inhibitor-positive patients with severe hemophilia A*. Thromb Haemost, 2003. **90**(5): p. 813-22.
89. Quaratino, S., L.P. Duddy, and M. Londei, *Fully competent dendritic cells as inducers of T cell anergy in autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(20): p. 10911-6.
90. Corthay, A., *A three-cell model for activation of naive T helper cells*. Scand J Immunol, 2006. **64**(2): p. 93-6.
91. Qian, J., et al., *Prevention and treatment of factor VIII inhibitors in murine hemophilia A*. Blood, 2000. **95**(4): p. 1324-9.
92. Reding, M.T., et al., *Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients*. Thromb Haemost, 2002. **88**(4): p. 568-75.
93. Hausl, C., et al., *Long-term persistence of anti-factor VIII antibody-secreting cells in hemophilic mice after treatment with human factor VIII*. Thromb Haemost, 2002. **87**(5): p. 840-5.
94. Hausl, C., et al., *Preventing restimulation of memory B cells in hemophilia A: a potential new strategy for the treatment of antibody-dependent immune disorders*. Blood, 2004. **104**(1): p. 115-22.
95. Wells, *The Science of life*. 1929: The Waverley Publishing Company. 1514.
96. Bretscher, P. and M. Cohn, *A theory of self-nonsel self discrimination*. Science, 1970. **169**(3950): p. 1042-9.
97. Lafferty, K.J. and A.J. Cunningham, *A new analysis of allogeneic interactions*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1975. **53**(1): p. 27-42.
98. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
99. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
100. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
101. Seong, S.Y. and P. Matzinger, *Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 469-78.

102. Sirisinha, S., *Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease*. Asian Pac J Allergy Immunol, 2011. **29**(1): p. 1-14.
103. De Gregorio, E., U. D'Oro, and A. Wack, *Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(3): p. 339-45.
104. Pfistershammer, K., et al., *Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells*. Thromb Haemost, 2006. **96**(3): p. 309-16.
105. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
106. Quintana, F.J. and I.R. Cohen, *Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2777-82.
107. Bours, M.J., et al., *Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation*. Pharmacol Ther, 2006. **112**(2): p. 358-404.
108. Kono, H., et al., *Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(6): p. 1939-49.
109. Babelova, A., et al., *Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24035-48.
110. Oppenheim, J.J., et al., *Alarmins initiate host defense*. Adv Exp Med Biol, 2007. **601**: p. 185-94.
111. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
112. Raut, S., et al., *Modification of factor VIII in therapeutic concentrates after virus inactivation by solvent-detergent and pasteurisation*. Thromb Haemost, 1998. **80**(4): p. 624-31.
113. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
114. Prowse, C.V. and I.R. MacGregor, *Neoantigens and antibodies to factor VIII*. Blood Rev, 1998. **12**(2): p. 99-105.
115. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors*. Curr Protoc Immunol, 2007. **Chapter 14**: p. Unit 14 12.
116. Kurnik, K., et al., *New early prophylaxis regimen that avoids immunological danger signals can reduce FVIII inhibitor development*. Haemophilia, 2010. **16**(2): p. 256-62.
117. Abraham, N.G. and A. Kappas, *Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(1): p. 79-127.
118. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications*. Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 583-650.
119. Wagener, F.A., et al., *The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing*. Blood, 2003. **102**(2): p. 521-8.
120. Dimitrov, J.D., et al., *Induction of heme oxygenase-1 in factor VIII-deficient mice reduces the immune response to therapeutic factor VIII*. Blood, 2010. **115**(13): p. 2682-5.
121. Dawes, J., et al., *High molecular weight aggregate content of heated and unheated factor VIII products determined by fast-protein liquid chromatography*. Vox Sang, 1990. **58**(1): p. 30-4.
122. Rosenberg, A.S., *Effects of protein aggregates: an immunologic perspective*. AAPS J, 2006. **8**(3): p. E501-7.
123. Purohit, V.S., C.R. Middaugh, and S.V. Balasubramanian, *Influence of aggregation on immunogenicity of recombinant human Factor VIII in hemophilia A mice*. J Pharm Sci, 2006. **95**(2): p. 358-71.

124. Gaitonde, P., et al., *Downregulation of CD40 signal and induction of TGF-beta by phosphatidylinositol mediates reduction in immunogenicity against recombinant human Factor VIII*. J Pharm Sci, 2012. **101**(1): p. 48-55.
125. Smiley, S.T., J.A. King, and W.W. Hancock, *Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4*. J Immunol, 2001. **167**(5): p. 2887-94.
126. Dargaud, Y., et al., *Evaluation of thrombin generating capacity in plasma from patients with haemophilia A and B*. Thromb Haemost, 2005. **93**(3): p. 475-80.
127. Skupsky, J., et al., *A role for thrombin in the initiation of the immune response to therapeutic factor VIII*. Blood, 2009. **114**(21): p. 4741-8.
128. Bluteau, D., et al., *Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 227-34.
129. Italiano, J.E., Jr., et al., *Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes*. J Cell Biol, 1999. **147**(6): p. 1299-312.
130. Jandrot-Perrus, M. and P. Nurden, *[From platelet functions to therapy]*. Rev Med Interne, 2010. **31 Suppl 3**: p. S319-23.
131. George, J.N., *Platelets*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1531-9.
132. Denis, M.M., et al., *Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets*. Cell, 2005. **122**(3): p. 379-91.
133. Lindemann, S., et al., *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 485-90.
134. Sehgal, S. and B. Storrie, *Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(10): p. 2009-16.
135. Italiano, J.E., Jr., et al., *Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1227-33.
136. Coppinger, J.A., et al., *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2096-104.
137. Grozovsky, R., K.M. Hoffmeister, and H. Falet, *Novel clearance mechanisms of platelets*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(6): p. 585-9.
138. Hartley, P.S., *Platelet senescence and death*. Clin Lab, 2007. **53**(3-4): p. 157-66.
139. Ruggeri, Z.M., *Platelet adhesion under flow*. Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 58-83.
140. Jackson, S.P., W.S. Nesbitt, and S. Kulkarni, *Signaling events underlying thrombus formation*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1602-12.
141. Shattil, S.J., H. Kashiwagi, and N. Pampori, *Integrin signaling: the platelet paradigm*. Blood, 1998. **91**(8): p. 2645-57.
142. Antoniadou, C., et al., *Platelet activation in atherogenesis associated with low-grade inflammation*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2010. **9**(5): p. 334-45.
143. Boilard, E., et al., *Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production*. Science, 2010. **327**(5965): p. 580-3.
144. Collins, C.E., et al., *Platelets circulate in an activated state in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1994. **106**(4): p. 840-5.
145. Solanilla, A., et al., *Platelet-associated CD154 in immune thrombocytopenic purpura*. Blood, 2005. **105**(1): p. 215-8.
146. Rosenfeld, S.I., et al., *Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G. Identification as a 40,000-molecular-weight membrane protein shared by monocytes*. J Clin Invest, 1985. **76**(6): p. 2317-22.

147. Joseph, M., et al., *A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes*. Nature, 1983. **303**(5920): p. 810-2.
148. Bout, D., et al., *Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein*. Science, 1986. **231**(4734): p. 153-6.
149. Cosgrove, L.J., et al., *CR3 receptor on platelets and its role in the prostaglandin metabolic pathway*. Immunol Cell Biol, 1987. **65** (Pt 6): p. 453-60.
150. Clemetson, K.J., et al., *Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4046-54.
151. Pancre, V., et al., *Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of Schistosoma mansoni*. Eur Cytokine Netw, 1990. **1**(1): p. 15-9.
152. Yeaman, M.R., *Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defense*. Future Microbiol, 2010. **5**(3): p. 471-506.
153. Cognasse, F., et al., *Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(2): p. 196-8.
154. Shiraki, R., et al., *Expression of Toll-like receptors on human platelets*. Thromb Res, 2004. **113**(6): p. 379-85.
155. Aslam, R., et al., *Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo*. Blood, 2006. **107**(2): p. 637-41.
156. Spinelli, S.L., et al., *Platelets and megakaryocytes contain functional nuclear factor-kappaB*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(3): p. 591-8.
157. Andre, P., et al., *Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 896-9.
158. Hawrylowicz, C.M., G.L. Howells, and M. Feldmann, *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 785-90.
159. Urbich, C., et al., *CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 981-6.
160. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
161. Petti, C.A. and V.G. Fowler, Jr., *Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis*. Cardiol Clin, 2003. **21**(2): p. 219-33, vii.
162. Levi, M., et al., *Infection and inflammation and the coagulation system*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(1): p. 26-39.
163. Kerrigan, S.W., et al., *A role for glycoprotein Ib in Streptococcus sanguis-induced platelet aggregation*. Blood, 2002. **100**(2): p. 509-16.
164. O'Brien, L., et al., *Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A*. Mol Microbiol, 2002. **44**(4): p. 1033-44.
165. Kalvegren, H., M. Majeed, and T. Bengtsson, *Chlamydia pneumoniae binds to platelets and triggers P-selectin expression and aggregation: a causal role in cardiovascular disease?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1677-83.
166. Copley, A.L., B. Maupin, and T. Balea, *The agglutinant and adhesive behaviour of isolated human and rabbit platelets in contact with various strains of mycobacteria*. Acta Tuberc Scand, 1959. **37**: p. 151-61.
167. Youssefian, T., et al., *Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4021-9.

168. Terada, H., et al., *Interaction of influenza virus with blood platelets*. Blood, 1966. **28**(2): p. 213-28.
169. Bik, T., I. Sarov, and A. Livne, *Interaction between vaccinia virus and human blood platelets*. Blood, 1982. **59**(3): p. 482-7.
170. Yeaman, M.R., *The role of platelets in antimicrobial host defense*. Clin Infect Dis, 1997. **25**(5): p. 951-68; quiz 969-70.
171. Maisch, P.A. and R.A. Calderone, *Role of surface mannan in the adherence of Candida albicans to fibrin-platelet clots formed in vitro*. Infect Immun, 1981. **32**(1): p. 92-7.
172. Christin, L., et al., *Human platelets damage Aspergillus fumigatus hyphae and may supplement killing by neutrophils*. Infect Immun, 1998. **66**(3): p. 1181-9.
173. Yong, E.C., et al., *Human platelet-mediated cytotoxicity against Toxoplasma gondii: role of thromboxane*. J Exp Med, 1991. **173**(1): p. 65-78.
174. Peyron, F., et al., *Plasmodium falciparum growth inhibition by human platelets in vitro*. Parasitology, 1989. **99 Pt 3**: p. 317-22.
175. Verschoor, A., et al., *A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8alpha+ dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3*. Nat Immunol, 2011. **12**(12): p. 1194-201.
176. Chapman, L.M., et al., *Platelets Present Antigen in the Context of MHC Class I*. J Immunol, 2012.
177. van Bladel, E.R., et al., *Up-regulation of platelet activation in hemophilia A*. Haematologica, 2011. **96**(6): p. 888-95.
178. Grunewald, M., et al., *Absence of compensatory platelet activation in patients with severe haemophilia, but evidence for a platelet collagen-activation defect*. Platelets, 2002. **13**(8): p. 451-8.
179. Amith, S.R., *The role of NEU1 sialidase in toll-like receptor activation*, in *Department of Microbiology and Immunology*. 2009, Queen's University: Kingston, Ontario, Canada. p. 299.
180. Jobi, K., et al., *Redox regulation of human protease-activated receptor-2 by activated factor X*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(9): p. 1758-64.
181. Ruf, W., A. Dorfleutner, and M. Riewald, *Specificity of coagulation factor signaling*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1495-503.
182. Elzey, B.D., et al., *Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 9-19.
183. Davi, G. and C. Patrono, *Platelet activation and atherothrombosis*. N Engl J Med, 2007. **357**(24): p. 2482-94.
184. Ross, T.M., et al., *C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 127-31.
185. Yarovinsky, F., et al., *Toll-like receptor recognition regulates immunodominance in an antimicrobial CD4+ T cell response*. Immunity, 2006. **25**(4): p. 655-64.
186. Burgdorf, S., et al., *Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation*. Science, 2007. **316**(5824): p. 612-6.
187. Dudziak, D., et al., *Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo*. Science, 2007. **315**(5808): p. 107-11.
188. Gringhuis, S.I., et al., *Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 203-13.
189. Amith, S.R., et al., *Detection of Neu1 sialidase activity in regulating Toll-like receptor activation*. J Vis Exp, 2010(43).

190. Hua, H., et al., *Phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells (DCs) induced by purified Glycyrrhizin (GL)*. *Int Immunopharmacol*, 2012. **12**(3): p. 518-25.
191. Peng, A., R.M. Straubinger, and S.V. Balu-Iyer, *Phosphatidylinositol containing lipidic particles reduces immunogenicity and catabolism of factor VIII in hemophilia a mice*. *AAPS J*, 2010. **12**(3): p. 473-81.
192. Borissoff, J.I., H.M. Spronk, and H. ten Cate, *The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(18): p. 1746-60.
193. Semeraro, N., et al., *Sepsis, thrombosis and organ dysfunction*. *Thromb Res*, 2012. **129**(3): p. 290-5.
194. Olinde, J.G., et al., *Persantine attenuates hemorrhagic shock-induced P-selectin expression*. *Am Surg*, 2000. **66**(12): p. 1093-7; discussion 1097-8.
195. Molho, P., et al., *Epidemiological survey of the orthopaedic status of severe haemophilia A and B patients in France. The French Study Group. secretariat.haemophiles@cch.ap-hop-paris.fr*. *Haemophilia*, 2000. **6**(1): p. 23-32.
196. Oldenburg, J., O. El-Maarri, and R. Schwaab, *Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes*. *Haemophilia*, 2002. **8 Suppl 2**: p. 23-9.
197. Hodgkinson, C.P., K. Patel, and S. Ye, *Functional Toll-like receptor 4 mutations modulate the response to fibrinogen*. *Thromb Haemost*, 2008. **100**(2): p. 301-7.
198. Davalos, D. and K. Akassoglou, *Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease*. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(1): p. 43-62.
199. Auerswald, G., C. Bidlingmaier, and K. Kurnik, *Early prophylaxis/FVIII tolerization regimen that avoids immunological danger signals is still effective in minimizing FVIII inhibitor developments in previously untreated patients--long-term follow-up and continuing experience*. *Haemophilia*, 2012. **18**(1): p. e18-20.
200. Lundvig, D.M., S. Immenschuh, and F.A. Wagener, *Heme oxygenase, inflammation, and fibrosis: the good, the bad, and the ugly?* *Front Pharmacol*, 2012. **3**: p. 81.
201. Wink, D.A., et al., *Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response*. *J Leukoc Biol*, 2011. **89**(6): p. 873-91.
202. Hirsh, J., et al., *Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range*. *Chest*, 2001. **119**(1 Suppl): p. 8S-21S.
203. Macfarlane, S.R., et al., *Proteinase-activated receptors*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(2): p. 245-82.
204. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
205. Park, Y., et al., *Effect of PAR2 in regulating TNF-alpha and NAD(P)H oxidase in coronary arterioles in type 2 diabetic mice*. *Basic Res Cardiol*, 2011. **106**(1): p. 111-23.
206. Kataoka, H., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells*. *Blood*, 2003. **102**(9): p. 3224-31.
207. Nakanishi-Matsui, M., et al., *PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin*. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 609-13.
208. Jin, J. and S.P. Kunapuli, *Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(14): p. 8070-4.
209. Kroczyk, R.A., et al., *Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)"*. *Immunol Rev*, 1994. **138**: p. 39-59.
210. Qian, J., et al., *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*, 2000. **30**(9): p. 2548-54.

211. Reipert, B.M., et al., *Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance*. *Thromb Haemost*, 2001. **86**(6): p. 1345-52.
212. Rossi, G., J. Sarkar, and D. Scandella, *Long-term induction of immune tolerance after blockade of CD40-CD40L interaction in a mouse model of hemophilia A*. *Blood*, 2001. **97**(9): p. 2750-7.
213. Ewenstein, B.M., et al., *Inhibition of CD40 ligand (CD154) in the treatment of factor VIII inhibitors*. *Haematologica*, 2000. **85**(10 Suppl): p. 35-9.
214. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. *J Exp Med*, 1994. **180**(4): p. 1263-72.
215. Fox, R.A., E.J. Neufeld, and C.M. Bennett, *Rituximab for adolescents with haemophilia and high titre inhibitors*. *Haemophilia*, 2006. **12**(3): p. 218-22.
216. Biss, T.T., M.R. Velangi, and J.P. Hanley, *Failure of rituximab to induce immune tolerance in a boy with severe haemophilia A and an alloimmune factor VIII antibody: a case report and review of the literature*. *Haemophilia*, 2006. **12**(3): p. 280-4.
217. Moschovi, M., et al., *Rituximab in the treatment of high responding inhibitors in severe haemophilia A*. *Haemophilia*, 2006. **12**(1): p. 95-9.
218. Kessel, C., et al., *Humoral immune responsiveness to a defined epitope on factor VIII before and after B cell ablation with rituximab*. *Mol Immunol*, 2008. **46**(1): p. 8-15.
219. Waters, B., et al., *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*, 2009. **113**(1): p. 193-203.
220. Lenting, P.J., et al., *The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(34): p. 23734-9.
221. Pegon, J.N., et al., *Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5*. *Haematologica*, 2012.
222. Dasgupta, S., et al., *Factor VIII bypasses CD91/LRP for endocytosis by dendritic cells leading to T-cell activation*. *Haematologica*, 2008. **93**(1): p. 83-9.
223. Repesse, Y., et al., *Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells*. *J Allergy Clin Immunol*, 2012. **129**(4): p. 1172-3; author reply 1174-5.

VI- ANNEXES