



# Identification des épitopes T d'ADAMTS13 chez les patients atteints de Purpura Thrombotique Thrombocytopénique

Laurent Gilardin

## ► To cite this version:

Laurent Gilardin. Identification des épitopes T d'ADAMTS13 chez les patients atteints de Purpura Thrombotique Thrombocytopénique. Immunité adaptative. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS520 . tel-02612959

**HAL Id: tel-02612959**

**<https://theses.hal.science/tel-02612959>**

Submitted on 19 May 2020

**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.

# Identification des épitopes T d'ADAMTS13 chez les patients atteints de Purpura Thrombotique Thrombocytopénique

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

École doctorale n°577 : structure et dynamique des systèmes vivants  
(SDSV)  
Spécialité de doctorat : sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 9/12/2019, par

**Laurent GILARDIN**

## Composition du Jury :

|                                                                                    |                       |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Mme Guislaine CARCELAIN<br>Professeur, Université de Paris                         | Présidente            |
| M. François LEMONNIER<br>Directeur de Recherche Emérite, INSERM                    | Rapporteur            |
| M. Ygal BENHAMOU<br>Professeur, Université de Rouen                                | Rapporteur            |
| M. Arnaud MORIS<br>Directeur de recherche, Université Paris-Saclay                 | Examineur             |
| M. Bertrand BELLIER<br>Professeur, Sorbonne Université                             | Examineur             |
| M. Simon SAULE<br>Professeur, Université Paris Sud                                 | Directeur de thèse    |
| M. Sébastien LACROIX-DESMAZES<br>Directeur de recherche, CNRS, Sorbonne Université | Co-Directeur de thèse |

# SOMMAIRE

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| I – INTRODUCTION.....                                            | 3         |
| <b>A. Généralités et historique .....</b>                        | <b>3</b>  |
| <b>B. Caractéristiques d’ADAMTS13.....</b>                       | <b>5</b>  |
| 1) Structure .....                                               | 5         |
| 2) Gène et synthèse .....                                        | 7         |
| 3) Fonction.....                                                 | 10        |
| 4) Mutations et polymorphismes .....                             | 18        |
| 5) Immunogénicité.....                                           | 19        |
| 6) ADAMTS13 murine.....                                          | 21        |
| <b>C. Purpura thrombotique thrombocytopénique .....</b>          | <b>23</b> |
| 1) Rappels cliniques.....                                        | 23        |
| 2) Physiopathologie (hors immunologie) .....                     | 25        |
| 3) Modèles animaux .....                                         | 26        |
| 4) Diagnostic.....                                               | 27        |
| 5) Traitement et pronostic.....                                  | 29        |
| <b>D. Aspects immunologiques du PTT.....</b>                     | <b>31</b> |
| 1) Etude des lymphocytes B et épitopes B.....                    | 31        |
| 2) PTT et autres manifestations auto-immunes .....               | 37        |
| 3) Liens entre infections, complément et PTT.....                | 38        |
| 4) Restriction HLA .....                                         | 41        |
| 5) Etudes des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> et épitopes T ..... | 43        |
| II – OBJECTIFS DU TRAVAIL.....                                   | 47        |
| III – RESULTATS.....                                             | 48        |
| <b>A. Article 1 : Résumé .....</b>                               | <b>48</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                            | <b>51</b> |
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                        | <b>52</b> |
| <b>METHODS .....</b>                                             | <b>53</b> |
| <b>RESULTS .....</b>                                             | <b>61</b> |
| <b>DISCUSSION .....</b>                                          | <b>65</b> |
| <b>REFERENCES.....</b>                                           | <b>69</b> |
| <b>TABLES .....</b>                                              | <b>74</b> |
| <b>FIGURE LEGENDS .....</b>                                      | <b>76</b> |

|                                                                                                                 |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>B. Résultats complémentaires, non publiés.....</b>                                                           | <b>81</b>  |
| 1) Analyse IEDB pour l'allèle HLA DRB1*11:01.....                                                               | 81         |
| 2) Tests de stimulation de lignées lymphocytaires T CD4+ DR11 .....                                             | 83         |
| <b>IV – DISCUSSION.....</b>                                                                                     | <b>87</b>  |
| <b>A. Méthode d'identification des épitopes T.....</b>                                                          | <b>87</b>  |
| 1) Rappels d'immunologie générale.....                                                                          | 87         |
| 2) Rappels et précisions concernant l'approche utilisée dans ce travail .....                                   | 90         |
| 3) Forces et limites de la méthode utilisée.....                                                                | 94         |
| <b>B. Particularités des épitopes T d'ADAMTS13.....</b>                                                         | <b>106</b> |
| 1) Le peptide 1239-1253 est l'épitope T dominant d'ADAMTS13 chez les patients atteints de PTT acquis.....       | 106        |
| 2) Analyse des épitopes T au sein de la séquence d'ADAMTS13 .....                                               | 108        |
| 3) Cas des peptides <sup>1328</sup> FINVAPHAR <sup>1336</sup> et <sup>1358</sup> ASYILIRD <sup>1365</sup> ..... | 110        |
| 4) Epitope T et HLA .....                                                                                       | 112        |
| 5) Epitope T et épitope B.....                                                                                  | 114        |
| <b>C. Autres maladies auto-immunes spécifiques d'antigène .....</b>                                             | <b>116</b> |
| <b>V – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>                                                                    | <b>120</b> |
| Liste des abréviations .....                                                                                    | 141        |
| Liste des Figures et Tableaux (Hors résultats des articles) .....                                               | 142        |
| <b>VI – ANNEXES.....</b>                                                                                        | <b>143</b> |

## I – INTRODUCTION

### A. Généralités et historique

Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) acquis est une maladie auto-immune rare (4 cas/10<sup>6</sup> habitants/an) et grave caractérisée par la présence d'anticorps dirigés contre la protéine "A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 repeats, 13th member" ou ADAMTS13 (A13).

La découverte d'A13 est directement liée à l'étude des patients atteints de PTT et à leur prise en charge.

Décrit pour la première fois par Moschcowitz en 1924 **(1,2)**, le PTT associe anémie hémolytique auto-immune, fièvre, thrombopénie de consommation et défaillance d'organes de sévérité variable. Il a été montré que la maladie était provoquée par des microthrombi disséminés dans les vaisseaux de petit calibre, composés de plaquettes et de fibrine, sans lésion inflammatoire **(3)**, ni activation de la cascade de la coagulation **(4)**, contrairement aux thrombi retrouvés dans les maladies thromboemboliques classiques.

Employés empiriquement dès 1959 comme traitement du PTT, les échanges transfusionnels de sang total ont montré une remarquable efficacité **(5–7)**. Le mécanisme suspecté était l'épuration d'un facteur « toxique pour les petits vaisseaux sanguins » et l'apport d'une « substance bénéfique du plasma transfusé » **(7)**. Il a par la suite été démontré que le plasma issu de patients atteints de PTT était capable d'induire une agrégation plaquettaire *in vitro* et que celle-ci était inhibée par le plasma de sujets sains **(8)**. Dans le même temps, le traitement par perfusion de plasma **(9)** ou par échanges plasmatiques **(10)** s'est révélé efficace chez environ 60 à 80% des patients, les faisant préférer aux échanges transfusionnels. A la fin des années 70, l'hypothèse physiopathologique retenue était alors un déficit en un facteur

plasmatique inhibiteur, contrebalançant l'effet pro-agrégant plaquettaire d'un facteur présent dans les plasmas de patients atteints de PTT **(8,11)**.

En 1982, Moake *et al.* ont constaté dans le plasma de 4 patients atteints de PTT, la présence de multimères de taille inhabituellement grande de Facteur Willebrand (FW). Dès lors, il a été suggéré que le composant manquant, apporté par les transfusions de plasma, devait être une protéase permettant de cliver les méga-multimères de FW, eux-mêmes responsables de l'hyperagréabilité plaquettaire des patients atteints de PTT **(12)**. Il fut d'ailleurs rapidement démontré que les thrombi plaquettaires des patients atteints de PTT étaient riches en FW **(13)**. La protéase du FW ne fut isolée qu'en 1996, par deux équipes concurrentes utilisant des approches similaires de purification séquentielle de plasma **(14,15)** avec mise au point d'un test fonctionnel de clivage du FW, montrant qu'il s'agissait d'une métalloprotéase. L'année suivante, Furlan *et al.* retrouvaient un déficit d'activité de cette protéase chez 4 patients atteints de formes chroniques récidivantes de PTT **(16)** et en 1998, la physiopathologie du PTT acquis a pu être précisée, avec la mise en évidence d'anticorps inhibiteurs de la protéase du FW **(17–19)**.

En 2001, en ayant recours à des analyses par clonage positionnel chez des familles de patients atteints de PTT héréditaire, Levy *et al.* ont identifié le gène, cloné et nommé cette protéase comme étant A13, mettant en évidence son implication dans la physiopathologie de la maladie **(20)**. Dès lors, la protéine a été caractérisée sur le plan structurel et fonctionnel.

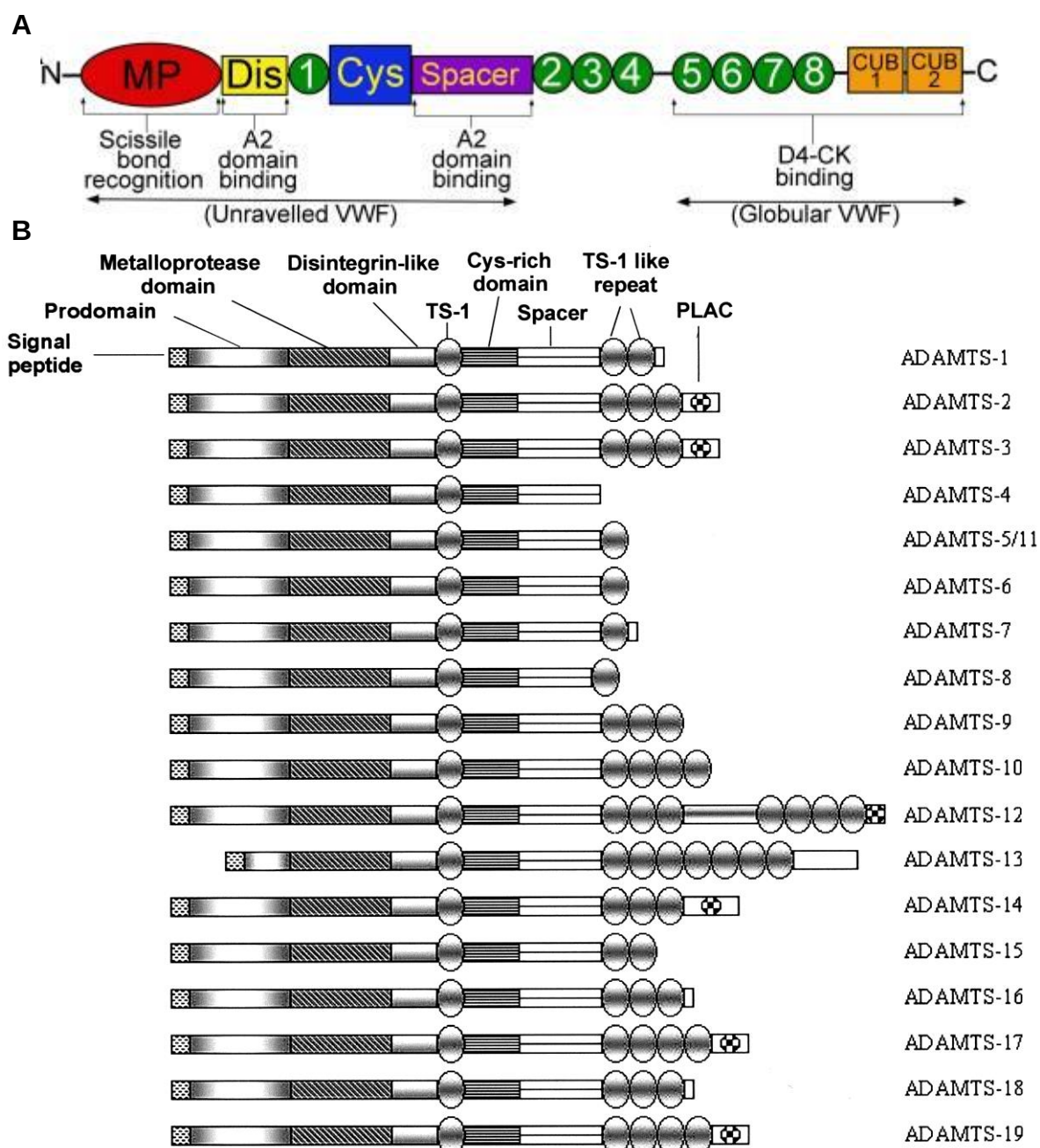
Le PTT résulte donc d'un déficit sévère en A13 pouvant être expliqué par deux mécanismes : l'un héréditaire (< 5% des cas) lié à des mutations du gène codant A13 et qui se superpose globalement aux rares formes pédiatriques, l'autre acquis (>95% des cas) lié à des auto-anticorps dirigés contre A13 et qui correspond aux formes de l'adulte. Les échanges plasmatiques, qui éliminent les anticorps et apportent de l'A13 fonctionnelle ont montré leur supériorité aux perfusions de plasma et constituent le traitement de choix du PTT acquis **(21)**.

## **B. Caractéristiques d'ADAMTS13**

A13 est donc la protéase spécifique du FW, intervenant ainsi dans l'hémostase primaire. Il s'agit d'une glycoprotéine plasmatique monocaténaire.

### **1) Structure**

En 2001, plusieurs groupes ont décrit la structure d'A13 **(20,22–25)**. Elle appartient à la famille des protéines ADAMTS (A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 repeats) **(26–29)**. Elle comporte 1427 acides aminés répartis en plusieurs domaines dont certains sont communs aux autres membres de la famille ADAMTS (Figure 1A et 1B) : peptide signal, propeptide, domaine métalloprotéase, domaine de type désintégrine, domaine de type « ADAMTS spacer », domaine thrombospondine de type 1 et domaine riche en cystéines. Le domaine catalytique possède deux sites de fixation pour des ions : un pour le zinc et l'autre pour le calcium. Les autres domaines consistent en 7 répétitions du domaine thrombospondine de type 1 (TSR), et 2 domaines CUB (Complement C1r/C1s, sea Urchin epidermal growth factor, and Bone morphogenetic protein) uniques au sein de la famille ADAMTS. Ces domaines CUB ont été trouvés dans de multiples familles de protéines, dont des protéases, où ils sont impliqués dans la reconnaissance du substrat **(30,31)**. L'autre particularité d'A13 au sein de la famille des ADAMTS est la taille particulièrement courte du propeptide (41 acides aminés). Son clivage n'est pas nécessaire pour l'activation du site catalytique **(32)**.



**Figure 1 :** Structure de la protéine ADAMTS13 et autres membres de la famille ADAMTS.

Partie A : en partie N terminale, on retrouve le domaine métalloprotéase (acides aminés en position 80 à 286, MP, en rouge), le domaine de type désintégrine (position 287 à 383, Dis; en jaune), les domaines thrombospondine de type 1 (n°1 : position 384 à 439, n°2 : 682 à 730, n°3 : 742 à 805, n°4 : 808 à 859, n°5 : 896 à 950, n°6 : 951 à 1011, n°7 : 1012 à 1068, n°8 : 1072 à 1131; en vert), le domaine riche en cystéine (position 440 à 556, Cys, en bleu), le domaine de type « ADAMTS spacer », (position 556 à 685, Spacer, en violet) et les domaines CUB (CUB1 position 1192 à 1298 et CUB2 position 1299 à 1427, en orange). Les sites de fixation aux domaines du Facteur Willebrand sont indiqués en dessous. Source : (33).

Partie B : les domaines des différents membres de la famille des protéines ADAMTS sont représentés. TS : thrombospondin-like; PLAC : protease-lacunin. Source : (28).

## 2) Gène et synthèse

Chez l'homme, le gène codant A13 est situé sur le chromosome 9, en position 9q34, il comporte environ 37000 paires de base, réparties en 29 exons. Par analyse de la séquence nucléotidique, quatre isoformes possibles de la protéine, dû à des épissages alternatifs au niveau du domaine désintégrine, du domaine spacer et du domaine CUB1 ont été identifiés, mais leurs caractéristiques détaillées n'ont pas été décrites **(20,24,25,28)**.

Le poids moléculaire de la protéine a été calculé à environ 154 kDa alors que celui de la protéine purifiée est mesuré à 190 kDa, faisant évoquer des modifications post-traductionnelles avec en particulier des glycosylations dont les sites de conjugaison ont été identifiés à différents niveaux, pour différents types de sucres (Tableau 1), dont en particulier des sucres se terminant par des mannoses et possédant des fucoses **(34–37)**.

| Localisation - résidu | Type de glycosylation     |
|-----------------------|---------------------------|
| 142 – Asn             | N-glycosylation           |
| 146 – Asn             | N-glycosylation           |
| 390 – Trp             | C-glycosylation - Mannose |
| 399 – Ser             | O-glycosylation - Fucose  |
| 552 – Asn             | N-glycosylation           |
| 579 – Asn             | N-glycosylation           |
| 614 – Asn             | N-glycosylation           |
| 667 – Asn             | N-glycosylation           |
| 698 – Ser             | O-glycosylation - Fucose  |
| 707 – Asn             | N-glycosylation           |
| 757 – Ser             | O-glycosylation - Fucose  |
| 828 – Asn             | N-glycosylation           |
| 884 – Trp             | C-glycosylation - Mannose |
| 907 – Ser             | O-glycosylation - Fucose  |
| 965 – Ser             | O-glycosylation - Fucose  |
| 1027 – Ser            | O-glycosylation - Fucose  |
| 1087 – Ser            | O-glycosylation - Fucose  |
| 1235 – Asn            | N-glycosylation           |
| 1354 – Asn            | N-glycosylation           |

**Tableau 1 :** Localisation des sites de glycosylations de la protéine ADAMTS13 avec le type de glycosylation retrouvé.

La cristallisation du fragment N-terminal de la protéine, contenant le site enzymatique, a été réalisée afin d'étudier ses interactions avec son substrat. Elle montre des repliements de la protéine dont certains sont permis par la présence de ponts disulfures qui sont retrouvés tout le long de la protéine **(38)**.

Son lieu de synthèse principal est le foie **(20,24,25,28,39,40)**, au niveau des cellules stellaires, dites cellules de Ito **(41)**. Elle est sécrétée dans une moindre mesure par les cellules endothéliales **(42–44)**, où elle est stockée dans les corps de Weibel-Palade, et par les plaquettes, où elle est stockée au sein des granules  $\alpha$  **(45,46)**. Elle serait aussi exprimée dans d'autres tissus : pancréas, placenta, ovaires, prostate, rein, pancréas, rate, thymus, cerveau... mais ces résultats sont controversés **(20,28,40)**. Son taux plasmatique est faible, estimé à environ 1 $\mu$ g/mL, soit environ 10 nM mais sa demi-vie est longue, mesurée à environ 2 à 3 jours **(47)**. Il ne semble pas y avoir de mécanisme de régulation transcriptionnelle **(40)**.

Une protéine recombinante A13 humaine a été développée par le laboratoire pharmaceutique Baxter<sup>®</sup>, à partir de cellules eucaryotes HEK293. Cette protéine s'est montrée fonctionnelle **(39)** en étant capable de cliver des multimères de FW de haut poids moléculaire in vitro issus de patients atteints de PTT acquis malgré la présence d'anticorps anti-A13, ce qui permet d'envisager des applications thérapeutiques dans les années à venir **(48)**.

### 3) Fonction

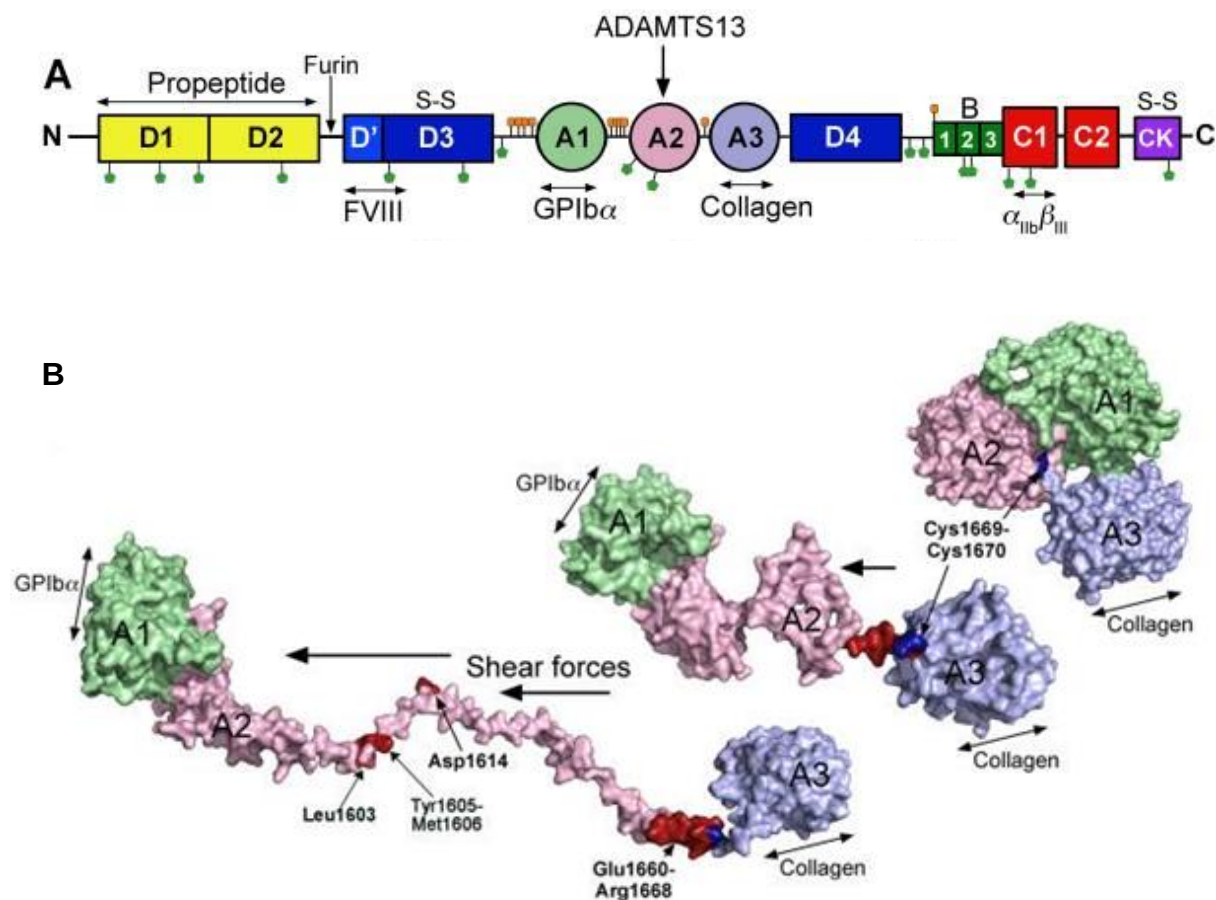
La fonction spécifique d'A13 est de cliver les multimères de FW. Ce couple enzyme-substrat est unique de par son mode de fonctionnement.

#### a) Facteur Willebrand

Le FW est une grande glycoprotéine multimérique, comportant environ 20 à 40 sous-unités **(49)**. Il permet l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium et leur agrégation après la survenue d'une brèche vasculaire **(50)**. Chaque sous-unité est composée de plusieurs domaines (Figure 2A) adoptant une forme globulaire, repliée, dans sa forme native, ce qui rend cryptique le site de fixation pour les plaquettes **(51)**. Le FW est produit par les cellules endothéliales, où il est stocké dans les corps de Weibel-Palade, et par les mégacaryocytes. Alors qu'il est sécrété en permanence en faible quantité, il peut, sous l'effet d'un stimulus, être libéré massivement par ces cellules sous la forme de grands multimères dits « méga-multimères » pouvant contenir jusqu'à 100 à 200 sous-unités. Les multimères les plus grands du FW (leur poids moléculaire pouvant dépasser 20 000 kDa) sont ceux qui ont la plus forte capacité adhésive au sous-endothélium et aux plaquettes **(52,53)**.

Lorsque survient une brèche vasculaire, le FW, sous sa forme globulaire, se fixe via son domaine A3, au collagène de type III de la paroi vasculaire **(54–56)**. Sous l'effet de forces de cisaillement présentes physiologiquement dans la circulation sanguine (« shear stress »), des modifications conformationnelles du FW interviennent, avec un déploiement de la région comportant les 3 domaines A1-A2-A3 et l'ensemble du domaine A2 **(57–59)** (Figure 2B). Cette forme déployée du FW libère au niveau du domaine A1, le site de fixation pour les plaquettes qui lient le FW par leurs glycoprotéines GPIb $\alpha$  **(60,61)** puis par les complexes

Gp2b3a membranaires (62). Il se forme ainsi le clou plaquettaire de l'hémostase primaire. Dans les conditions physiologiques normales, l'action d'A13 permet d'éviter la formation de thrombi plaquettaires dans les capillaires sanguins (63,64).



**Figure 2 :** Structure du Facteur Willebrand, déploiement et interactions avec ADAMTS13.

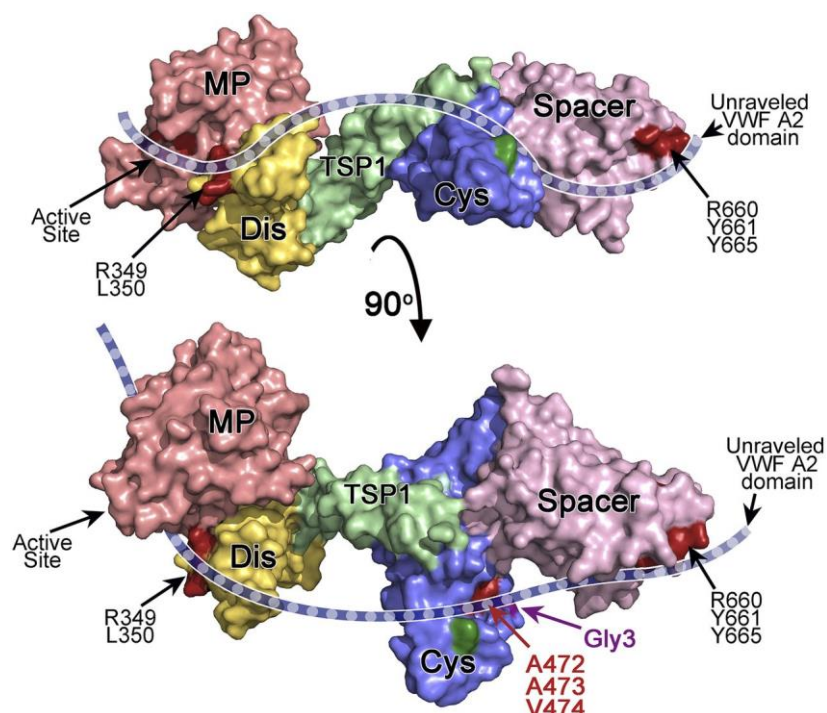
**Partie A :** en partie N terminale, on retrouve le domaine propeptide (D1 et D2, en jaune), puis les autres domaines D (D3 et D4, en bleu), les domaines A (A1, A2 et A3 en vert, rose et parme), les domaines B (B1, B2 et B3, en vert foncé), les domaines C (C1 et C2, en rouge) et le domaine Cystéine Knot (CK, en violet). Les sites de N- et O-glycosylation sont représentés par les cercles verts et orange respectivement. La mention S-S correspond aux sites de pont disulfure. Les flèches verticales montrent les sites de clivage (par la furine et par ADAMTS13). Les sites de fixation des ligands (Facteur VIII, GPIb $\alpha$ , collagen, and  $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ ) sont indiqués en dessous.

**Partie B :** Modèle moléculaire de déploiement des domaines A1-A2 et A3 du FW sous l'effet des forces de cisaillement (shear forces) : Dans la forme globulaire du FW, le site de fixation pour le collagène est exposé à la surface du domaine A3. Sous l'effet des forces de cisaillement, le FW se déploie, rendant accessibles les sites de fixation pour la protéine GPIb $\alpha$  sur le domaine A1 et ceux présents sur le domaine A2 pour ADAMTS13. Le site de clivage est indiqué en rouge. Source : (33)

#### b) Reconnaissance du Facteur Willebrand par ADAMTS13

La reconnaissance du FW par A13 est également dépendante des forces de cisaillement.

En effet, de multiples sites de fixation pour A13, au niveau du domaine A2, ne sont accessibles que lorsque le FW prend sa forme déployée, sous l'effet du changement de conformation induit par les forces de cisaillement. Les mécanismes moléculaires intervenant dans ces interactions réversibles et non covalentes ont été étudiés avec précision **(33)**. Le plus souvent, les moyens d'investigation utilisent des tests fonctionnels avec des mutants d'A13 et du FW, tronqués **(65,66)** ou complets **(67)**, en conditions statiques ou dynamiques (sous flux) **(63,68)**, reproduisant *in vitro* les forces de cisaillement présentes dans l'organisme, ou *in vivo* dans des modèles murins **(69–71)**. Les sites de fixation ont également été identifiés par cristallisation de fragments d'A13 **(38,72)**. Ces interactions sont détaillées dans la Figure 3 **(33)**.



**Figure 3 :** Interactions entre ADAMTS13 et le domaine A2 du Facteur Willebrand.

La forme cristallisée de la portion N-terminale d'ADAMTS13, comportant les domaines métalloprotéase (MP), désintégrine (Dis), thrombospondine de type 1 (TSP1), riche en cystéine (Cys), spacer (Spacer) est représentée en interaction avec le domaine A2 du Facteur Willebrand représenté sous sa forme déployée, linéaire. Les sites de fixation avec les résidus impliqués sont signalés par des flèches, soulignant le rôle important des domaines Dis, Cys et spacer pour l'ancrage du domaine A2 et permettre son clivage au niveau du site actif d'ADAMTS13. Source : (73).

En résumé, lorsque le FW prend sa forme déployée, les résidus Arg659, Arg660, Tyr661 et Tyr665, situés au niveau du domaine spacer d'A13, se lient avec les résidus Glu1660-Arg1668 du domaine A2 du FW (74–78). Puis, les résidus Gly471, Ala472 et Ala473 et Val474 du domaine riche en cystéine d'A13 formant une poche hydrophobique, permettent aux résidus Ile1642, Trp1644, Ile1649, Leu1650 et Ile1651 du domaine A2 du FW de se lier (73,79). Enfin, les résidus Arg349 et Arg350 du domaine désintégrine d'A13 se lient au résidu Asp1614 du domaine A2 du FW par une liaison de faible affinité afin de positionner correctement le substrat face au site catalytique métalloprotéase d'A13 (80,81).

Par ailleurs, il a été montré que la forme globulaire du FW pouvait fixer la partie C-terminale d'A13, sans induire la réaction enzymatique de clivage. Cette liaison intervient entre les domaines D4 et Cystéine Knot (CK) du FW et les domaines TSR 5 à 8, CUB1 et 2 d'A13 **(82,83)**. Elle aboutit à la formation de complexes A13/FW qui circulent dans le plasma et représenteraient 3% du stock d'A13 **(67)**. Ainsi, la colocalisation immédiate d'A13 et du FW au niveau d'une lésion vasculaire permet-elle à A13 de réaliser son action enzymatique dès que des forces de cisaillement modifient la conformation du FW **(84,85)**.

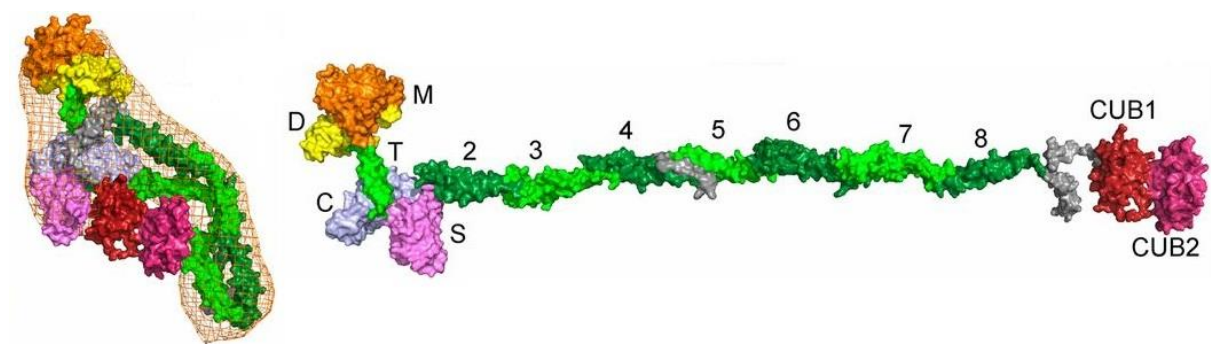
#### c) Clivage du FW

Le site spécifique de clivage du FW par A13 est situé dans le domaine A2, il s'agit d'un pont peptidique Tyr1605-Met1606, cryptique dans la forme globulaire du FW. Le site catalytique d'A13 est formé par une poche constituée des résidus His224, His228, His234 et Glu225, où se loge l'ion  $Zn^{2+}$ , au sein du domaine métalloprotéase **(86)**. Comme vu précédemment, il est nécessaire que le FW interagisse avec les domaines spacer, désintégrine et riche en cystéine afin de positionner le pont scissile Tyr1605-Met1606 en regard du site catalytique. De façon identique, les résidus Leu198, Leu232, Leu274 situés en région N terminale du domaine métalloprotéase d'A13 interagissent avec les résidus Leu1603 et Val1604 du domaine A2 du FW **(87,88)** pour stabiliser l'ancrage du FW et permettre son clivage.

#### d) Régulation

A13 a la particularité d'être sécrétée directement sous une forme active, le propeptide étant clivé dans la cellule par la furine. Cependant, il a été décrit récemment que les domaines TSR8, CUB1 et CUB2 d'A13 se fixent au niveau de la partie N-terminale de la protéine, conférant ainsi une configuration repliée à A13 (Figure 4) **(89,90)**. Cette forme masque les sites d'interaction des domaines spacer, riche en cystéine, désintégrine et métalloprotéase

avec le domaine A2 déployé du FW. Aussi, comme il existe un site de fixation des domaines TSR5 à 8, CUB1 et CUB2 d'A13 avec le domaine A3 du FW, il est très vraisemblable que le FW entraîne des changements conformationnels lorsqu'il se fixe à A13 par cette liaison. Le FW agit ainsi comme cofacteur d'A13, en plus d'en être le substrat.



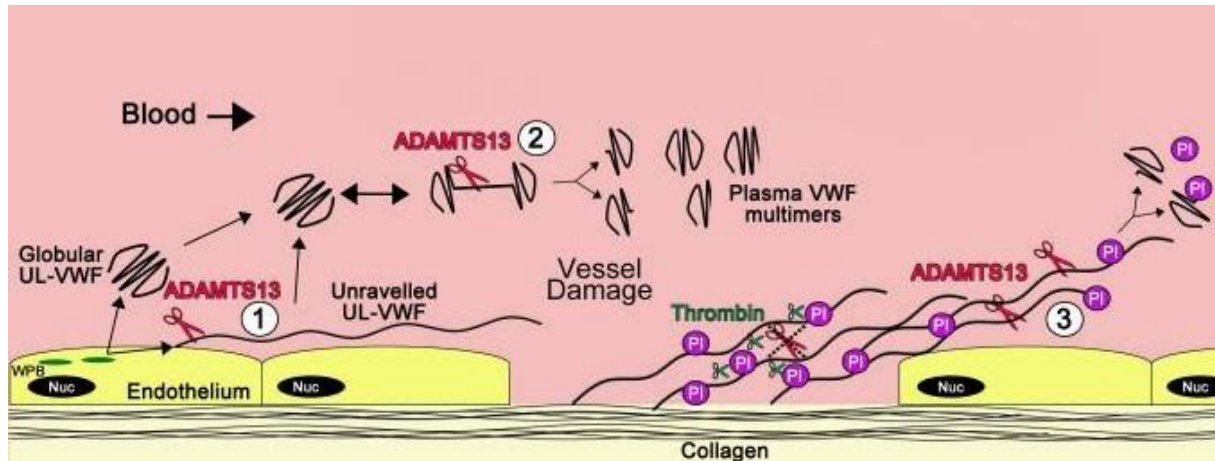
**Figure 4 :** Représentation d'ADAMTS13 selon un modèle moléculaire montrant la protéine sous une forme repliée.

A gauche, ADAMTS13 est représentée sous sa forme repliée, à droite, la forme dépliée permet d'identifier les domaines métalloprotéase (M), désintégrine (D), thrombospondine de type 1 (T), riche en cystéine (C) et spacer (S) et les domaines T (2 à 8) et les domaines CUB 1 et 2. Source : **(90)**

De plus, à la différence de la majorité des protéines impliquées dans la coagulation, l'activité d'A13 n'est pas régulée spécifiquement par un inhibiteur dédié. Toutefois, il a été montré que la thrombine et la plasmine **(91)** sont capables d'abolir son activité et de la cliver ; il existe notamment des sites de clivage au niveau des résidus 257, 459, 888 et 1176 d'A13. D'autres molécules telles que l'hémoglobine **(92)**, l'IL-6 **(93)**, le facteur X activé **(91)**, l'héparine, les ions hypochloriques et radicaux libres contenus dans les polynucléaires neutrophiles **(94,95)** sont capables d'inhiber l'activité d'A13. Leur rôle physiologique et physiopathologique n'est pas clair, même si Feys *et al.* ont décrit le cas d'un patient atteint de PTT acquis non médié par des anticorps, dont le déficit en A13 était en rapport avec une élimination de la protéase par la plasmine **(96)**.

Au total, il apparaît paradoxal que le processus de changement conformationnel du FW sous l'effet des forces de cisaillement permette la liaison des plaquettes avec le FW (en révélant le site de fixation cryptique sur le domaine A1) et permette dans le même temps le clivage du FW par A13, ce qui aurait tendance à limiter la formation du clou plaquettaire. Cependant, au niveau des lésions vasculaires, on retrouve aussi les facteurs de la coagulation de l'hémostase secondaire, dont la thrombine, qui inhiberait A13, laissant ainsi le caillot se former. A distance du caillot, lorsque le FW est relargué par les cellules endothéliales **(63,97)** ou présent dans les capillaires non lésés, A13 n'est pas inhibée, elle peut cliver les multimères de FW et ainsi contrôler l'agrégation plaquettaire (Figure 5). Il est à noter que les différences de vitesse d'interaction et d'activation entre le FW et A13 d'une part et entre le FW et les plaquettes **(61)** d'autre part peuvent également intervenir.

On retiendra également qu'A13 peut se fixer via les domaines TSR au récepteur CD36 présent sur l'endothélium et les plaquettes, permettant ainsi à A13 d'être retenue à proximité d'une éventuelle lésion vasculaire **(98)**.



**Figure 5 :** Représentation schématique de l'action d'ADAMTS13 sur le Facteur Willebrand dans la circulation sanguine.

Les multimères de facteur Willebrand (VWF, en noir), sont stockés au sein des cellules endothéliales dans les corps de Weibel-Palade (WPB; en vert) et libérés dans la circulation sanguine, y compris sous forme de mégamultimères globulaires (UL-VWF). (1) et (2) : ADAMTS13 (ciseaux rouges), clive le facteur Willebrand, qui se déploie sous l'effet des forces de cisaillement. (3) : en cas de lésion vasculaire, le facteur Willebrand se fixe au collagène sous-endothélial et se déploie sous l'effet des forces de cisaillement, ce qui permet l'agrégation des plaquettes (PI, cercles pleins violets). L'hémostase primaire et secondaire sont activées et la présence de thrombine (ciseaux verts) inhibe ADAMTS13, laissant ainsi le clou plaquettaire se former. A distance du site lésionnel, en l'absence de thrombine, ADAMTS13 peut cliver le facteur Willebrand et réguler le processus thrombotique. (Nuc : noyau). Source : (33)

#### 4) Mutations et polymorphismes

Plus de 140 mutations différentes ont été décrites à ce jour, touchant les différents domaines d'A13 **(99–101)**. Elles provoquent soit un défaut de la synthèse ou de la sécrétion de l'enzyme **(102,103)**, soit une diminution de son activité catalytique, partielle ou complète **(104)**. Leur retentissement dépend des modifications structurales provoquées par les mutations et la modification des interactions avec le FW qu'elles impliquent **(72,105–107)**. Elles sont responsables de l'apparition de PTT congénital, héréditaire, anciennement appelé syndrome d'Upshaw-Schulman (USS), suite à la description des premiers cas par ces auteurs en 1960 et 1978 **(108,109)**. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive, avec le plus souvent des doubles mutations, ponctuelles, hétérozygotes composites **(102)**. Ces mutations peuvent être des substitutions (60% des cas), des insertions (20%) ou des délétions (20%) pouvant provoquer un décalage du cadre de lecture et induire l'apparition d'un codon STOP.

Cliniquement, la moitié des patients atteints de USS est asymptomatique jusqu'à l'âge adulte **(110–113)** tandis que le reste présente des manifestations de la maladie à un âge précoce, typiquement dès la naissance **(99,114,115)**. Cette variabilité du phénotype peut être expliquée par le niveau de déficit en A13 **(116,117)** et par la survenue d'autres conditions physiopathologiques comme la grossesse **(118)**, l'âge, des infections, des traumatismes, la prise d'alcool ou de médicaments, et exceptionnellement d'autres mutations (comme notamment celles sur le gène codant le facteur H du complément), qui modifient les conditions rhéologiques de la circulation sanguine, la sécrétion de FW ou l'activation endothéliale et plaquettaire. Chez ces patients, des perfusions régulières de plasma sont

souvent nécessaires au long cours afin de prévenir les poussées de PTT **(115,119)**. A l'avenir, la protéine A13 recombinante pourrait faire partie des options thérapeutiques **(120)**.

Par ailleurs, de nombreux polymorphismes ont été identifiés **(121,122)**. Certains peuvent provoquer une diminution modérée de l'activité enzymatique. Ils sont retrouvés à des fréquences plus élevées chez certaines populations, ce qui pourrait constituer un facteur de risque cardio-vasculaire, compte tenu de l'implication d'A13 dans l'hémostase primaire **(123–127)**. Aussi, il a été possible de générer par mutagenèse dirigée des variants responsables d'un gain de fonction rendant la protéine résistante à l'effet inhibiteur d'anticorps de patients atteints de PTT acquis **(128,129)**.

## 5) Immunogénicité

On définit l'immunogénicité d'une protéine par sa capacité intrinsèque à induire une réponse immunitaire. Concernant A13, il est intéressant de constater que chez les patients atteints de USS, les perfusions répétées de plasma, contenant de l'A13, n'induisent pas d'allo-immunisation **(115)**. En effet, il n'a pas été décrit jusqu'alors d'anticorps inhibiteurs anti-A13, apparus après perfusion de plasma. Cela pourrait être expliqué par les homologues entre A13 et les autres protéines de la famille ADAMTS mais aussi par les propriétés structurales particulières de la protéine, qui favorisent la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de celle-ci.

Dans le PTT acquis, les anticorps anti-A13 surviennent à la suite d'une rupture de tolérance au Soi, une réaction immunitaire anti-A13 se développe. Cependant, dans toute réaction immunitaire, les étapes préalables à l'apparition d'anticorps comportent la reconnaissance de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes et sa présentation aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Pour A13, Sorvillo *et al.* ont montré en 2012, que la protéine était reconnue et

endocytée par les cellules dendritiques dérivées des monocytes (MoDCs) immatures du sang périphérique humain. Cette endocytose est médiée par le récepteur MMR « mannose macrophage receptor » membranaire ou CD206 (130).

Le MMR est une lectine de type C, présente à la surface des macrophages et des cellules dendritiques. Il s'agit d'un récepteur transmembranaire dont la partie N-terminale, extracellulaire est composée de 8 domaines consécutifs de reconnaissance des carbohydrates de type C, suivi d'un domaine fibronectine de type II et d'un domaine riche en cystéine. Dans la partie C-terminale, intra-cytoplasmique, sa structure ne comporte pas de motifs permettant une transduction du signal. Il s'agit d'un récepteur important pour l'immunité innée et la phagocytose de micro-organismes pathogènes, qui fixe les oligosaccharides avec différentes affinités : importante pour le mannose et le fucose, moindre pour les résidus N-acétylglucosamine ou le glucose (131). Cette liaison est dépendante du calcium.

L'emplacement du site de liaison sur A13 avec le MMR n'a pas été déterminé mais la liaison pourrait intervenir préférentiellement avec les molécules de mannose, présentes au niveau de 2 résidus tryptophane, en position 390 et 884 sur les domaines TSR1 et 4 respectivement. Le MMR pourrait également se lier aux sucres possédant un fucose, présents au niveau de 7 résidus en position 399, 698, 757, 907, 965, 1027 et 1087, répartis sur les différents domaines TSR à l'exception notable du TSR4.

Dans leurs travaux, Sorvillo *et al.* ont utilisé une protéine A13 recombinante humaine, marquée par une molécule fluorescente (FITC), afin de la visualiser en microscopie confocale et par cytométrie en flux. Ils ont déterminé que son endocytose était dose-dépendante, abolie par des inhibiteurs spécifiques (EGTA et mannane) et significativement diminuée en présence d'anticorps anti-MMR et par l'emploi d'un siRNA spécifique. Ils ont également montré une fixation spécifique *in vitro* avec la forme soluble du récepteur MMR.

Après fixation d'A13 sur le MMR, ce complexe ligand-récepteur est endocyté, le récepteur est recyclé à la surface de la cellule et la protéine est dégradée en peptides. Ces peptides sont alors présentés aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

#### 6) ADAMTS13 murine

Chez la souris, la séquence du gène codant l'A13 a été déterminée en 2004 **(132)**. Il existe un degré d'homologie avec la séquence de l'A13 humaine d'environ 69%, avec 29 exons et la même organisation protéique en domaines : métalloprotéase, désintégrine, TSR1, riche en cystéine, spacer, TSR 2 à 8 et CUB1 et 2. Cependant, deux formes de la protéine sont produites : une forme complète de 1426 acides aminés et une forme tronquée de 1037 acides aminés, en raison de l'insertion d'un rétrotransposon IAP « intracisternal A Particle » dans l'intron 23, induisant l'apparition d'un codon STOP. Chez les souris C57BL/6 et BALB/c, les 2 formes de la protéine sont retrouvées. Sur le plan fonctionnel, bien que les 2 derniers domaines TSR et les 2 domaines CUB soient manquants, soit 405 acides aminés, la forme tronquée est aussi efficace que la forme complète pour cliver un fragment du domaine A2 du FW *in vitro*.

Par la suite, la protéine murine recombinante complète a été synthétisée et caractérisée par la firme pharmaceutique Baxter® en 2005 **(133)** en vue des études précliniques faisant intervenir l'A13 recombinante humaine. Sur le plan structural, des taux d'homologie variables selon les domaines (Tableau 2) ont été observés, allant de 39% pour TSR6 à 88% pour TSR1. Pour l'A13 murine, il existe 8 sites possibles de N-glycosylation en position 144, 148, 557, 564, 584, 619, 834 et 1057. Des sucres possédant un fucose sont potentiellement localisés sur chaque domaine TSR à l'exception des TSR4 et 6. Seul 1 site, en position Trp392 pourrait être glycosylé avec un sucre se terminant par un mannose. L'expression de l'A13 murine a été

retrouvée principalement dans le foie et à un moindre degré dans la rate, les poumons et les muscles striés.

La protéine murine clive *in vitro* le FW murin et le FW humain recombinants d'une façon comparable à son homologue humaine, au niveau du pont Y1605-M1606 du domaine A2. Il est possible d'inhiber l'A13 murine avec le plasma de patients atteints de PTT acquis, ce qui témoigne d'une homologie de structure forte, au moins pour les régions impliquées dans l'activité catalytique.

| Domaine           | Similitude (%) |
|-------------------|----------------|
| Peptide signal    | 39             |
| Propeptide        | 43             |
| Métalloprotéase   | 77             |
| Désintégrine      | 81             |
| TSR 1             | 88             |
| Riche en cystéine | 80             |
| Spacer            | 75             |
| TSR 2             | 71             |
| TSR 3             | 72             |
| TSR 4             | 51             |
| TSR 5             | 77             |
| TSR 6             | 37             |
| TSR 7             | 76             |
| TSR 8             | 57             |
| CUB 1             | 74             |
| CUB 2             | 64             |

**Tableau 2 :** Degré d'homologie entre les domaines d'ADAMTS13 humaine et murine.  
Source : (133)

## C. **Purpura thrombotique thrombocytopénique**

Cette partie introductive a fait l'objet d'une publication fournie en Annexe 1 **(134)**.

### 1) Rappels cliniques

Cliniquement, le PTT est défini comme l'association d'une anémie hémolytique mécanique, d'une thrombopénie périphérique de consommation et de défaillances d'organes avec une atteinte neurologique prédominante. Chez l'adulte, le PTT survient préférentiellement chez la femme (3 femmes pour 2 hommes), au cours de la quatrième décennie. Les sujets de groupe sanguin O, les sujets noirs et les sujets d'Afrique du Nord semblent davantage exposés (135–137). L'incidence du PTT est évaluée à 4 cas par million d'habitant et par an (138,139). Le début de la maladie est brutal. Une phase prodromique associant asthénie, arthralgies, myalgies, douleurs abdominales et lombaires, pouvant évoquer un processus infectieux, précède souvent de quelques jours la survenue du PTT.

Historiquement, le diagnostic de PTT se faisait devant cinq signes cardinaux : fièvre, insuffisance rénale, atteinte cérébrale, anémie hémolytique mécanique et thrombopénie périphérique. Ce tableau correspond en fait aux formes les plus graves de la maladie ; ainsi, actuellement, une thrombopénie associée à une anémie hémolytique mécanique est-elle suffisante pour porter le diagnostic, même en l'absence de défaillances d'organe. Selon les séries de cas rapportés, la fièvre est présente dans 59 à 98% des cas. Une atteinte cérébrale s'observe dans 84 à 92% des cas. Celle-ci est caractérisée par son apparition brutale et sa fugacité, puisqu'elle peut atteindre différents territoires de manière intermittente, à quelques heures d'intervalle. Elle peut se manifester par un tableau de confusion avec obnubilation, des

céphalées, et des troubles de la conscience pouvant aller jusqu'au coma. Un déficit sensitif ou moteur systématisé, une dysarthrie, ou une aphasie peuvent être observés. Les réflexes ostéo-tendineux sont souvent vifs. Vingt p. 100 des patients peuvent présenter une crise convulsive, voire un état de mal épileptique. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) peut retrouver des images évocatrices d'ischémie. Une insuffisance rénale, en règle modérée, est retrouvée dans près de la moitié des cas. L'atteinte rénale peut se résumer à une protéinurie dont le débit est généralement inférieur à 3 g/24 h, ou à une hématurie.

Les autres manifestations témoignent du caractère disséminé du PTT. L'atteinte digestive se caractérise par des douleurs abdominales avec vomissements. Des atteintes pancréatiques peuvent être observées. Une atteinte cardiaque est possible, et peut se manifester par des douleurs thoraciques et des troubles de la repolarisation sur l'électrocardiogramme. Des nécroses myocardiques à la phase aiguë ainsi que des dysfonctions ventriculaires gauches séquellaires ont été décrites. Une élévation de la troponine plasmatique a été associée à un risque de dysfonction ventriculaire séquellaire et de mortalité accrue (140). Plus rarement, une atteinte pulmonaire avec défaillance respiratoire, et des atteintes oculaires peuvent survenir.

Parfois, il peut ne pas y avoir de défaillance d'organe évidente. Le PTT est alors purement hématologique, et se révèle par un syndrome hémorragique avec purpura, ecchymoses, hématomes, ou encore par une asthénie d'apparition récente, dans le cadre du syndrome anémique.

Le PTT évolue classiquement par poussées entrecoupées de périodes de rémission clinique. Les facteurs déclenchants des poussées sont multiples (infection, grossesse, certains médicaments comme les thiénoxydines) mais restent souvent non identifiés. **(134)**

## 2) Physiopathologie (hors immunologie)

Les mécanismes physiopathologiques précis responsables du PTT n'ont été compris que récemment, suite à la découverte d'A13 **(141)**. Comme vu précédemment, l'inhibition d'A13 par les auto-anticorps de type IgG entraîne une accumulation de multimères hyper adhésifs de FW libérés par l'endothélium. Ils provoquent alors des microthrombi plaquettaires qui obstruent la lumière des capillaires de la microcirculation et sont responsables d'ischémie et de souffrance viscérale disséminée, à l'origine du tableau de PTT. L'anémie hémolytique mécanique observée résulte de la fragmentation des érythrocytes, probablement secondaire aux turbulences présentes dans les capillaires partiellement occlus avec une pression environnante très élevée **(142)**. Elle se traduit par la présence de schizocytes sur le frottis sanguin, correspondant aux fragments de globules rouges détruits.

La libération de FW de haut poids moléculaire par les cellules endothéliales est une étape importante pour la survenue du PTT. Elle implique une activation endothéliale. Une étude récente portant sur 22 patients atteints de PTT acquis, a confirmé qu'il existait une activation endothéliale massive avec un important remodelage de l'endothélium au cours de la maladie. Différents marqueurs biologiques étaient augmentés à la phase aiguë et se normalisaient en période de rémission. La mesure des cellules endothéliales circulantes ou des cellules progénitrices endothéliales constituent des facteurs pronostics de la maladie **(143)**.

Ainsi, chez l'homme, le PTT serait provoqué par un déficit en A13 secondaire aux anticorps anti-A13 et un second événement serait nécessaire pour activer l'endothélium et reproduire la maladie (« two-hit model »).

Cependant, l'origine de cette activation endothéliale n'est pas clairement établie. Les modèles animaux de PTT ont permis de mieux comprendre le rôle et l'importance de l'activation endothéliale dans la physiopathologie de cette maladie.

### 3) Modèles animaux

Les souris chez lesquelles le gène d'A13 a été inactivé (délétion des exons 1 à 6 codant pour le domaine catalytique) ne développent la maladie que dans un fond génétique de prédisposition : CASA/Rk, caractérisé par une expression endogène plus élevée de FW. Cependant, un PTT ne survient qu'après l'injection de shigatoxine, une toxine capable d'activer l'endothélium, ce qui souligne la participation probable des facteurs environnementaux dans la survenue de la maladie chez l'homme **(144,145)**. Dans un autre modèle, il a été possible de reproduire ces résultats en injectant une dose supraphysiologique de FW recombinant humain (2000 U/kg), équivalente au relargage massif de FW provoqué lors d'une puissante activation endothéliale **(146,147)**.

Cependant, un modèle de PTT acquis a été développé chez le primate non humain, sans stimulation évidente de l'endothélium. Des anticorps monoclonaux anti-A13 développés chez la souris et reconnaissant le domaine catalytique ont été injectés à des babouins (2 injections/jours, 2 jours). Une thrombopénie a été observée rapidement au cours des 24 heures, suivie d'une anémie hémolytique à 72 heures. Des microthrombi ont été observés au sein de la plupart des organes de manière identique à ce qui a été décrit chez l'homme, mais aucune souffrance d'organe n'a été observée. De plus, aucun animal n'est mort de la maladie, ce qui contraste avec le pronostic de la maladie humaine. Seule une injection prolongée (12 jours) d'anticorps était accompagnée d'une souffrance myocardique réversible à l'arrêt de l'injection des anticorps. A l'inverse du modèle murin, le modèle de PTT chez le primate non

humain suggère qu'un PTT pourrait survenir sans qu'il y ait nécessité constante d'un facteur déclenchant **(148)**, bien que l'injection d'une substance allogénique (anticorps murin) puisse être responsable d'une réaction endothéliale *a minima*.

Sur le plan thérapeutique, le modèle murin a permis d'apporter la preuve de concept d'une efficacité théorique d'une supplémentation en protéine A13, que ce soit par administration directe **(146)** ou par thérapie génique avec une synthèse de la protéine par les cellules hématopoïétiques **(149)**, par les plaquettes **(147)** ou par le foie **(150)**, ou lors de procédures de transfert *in utero* **(70)**.

On retiendra également que les anomalies biologiques observées dans ces modèles animaux surviennent avant l'apparition des symptômes cliniques. Cette observation justifie l'attitude clinique actuelle qui consiste à tenter de poser un diagnostic avant que les troubles vasculaires n'entraînent des défaillances d'organe avec des lésions irréversibles chez le patient.

#### 4) Diagnostic

Une fois suspecté cliniquement par la présence des signes décrits ci-dessus, la preuve diagnostique du PTT repose sur le dosage de l'activité A13 dans le plasma des patients. Deux principales techniques sont utilisées.

L'approche historique utilise le FW entier, recombinant ou provenant de concentrés de plasma humain **(151)**. Une première étape de dénaturation par l'urée ou la guanidine est nécessaire afin de déplier la molécule et de rendre accessible à A13 le site de clivage situé au niveau du domaine A2. Le FW déplié est alors incubé avec le plasma testé, dont l'A13 est activée par des cations divalents. Ensuite, le produit de digestion ou le FW résiduel est quantifié selon différentes méthodes, dont par exemple l'électrophorèse qui montrera la persistance de multimères de très haut poids moléculaire de FW en cas de PTT. Bien que faiblement

reproductibles, ces tests permettent de détecter dans la majorité des cas la présence d'un déficit sévère en activité A13 (<10%) **(152)**. Au total, cette technique lourde est peu adaptée à une utilisation en routine mais constitue la meilleure preuve directe d'une perte d'activité d'A13.

En 2005, Kokame *et al.* ont mis au point un test utilisant la technologie de fluorescence par transfert d'énergie par résonance (FRET) en synthétisant un fragment du FW long de 73 acides aminés, contenant le site de clivage par A13. Ce test permet de donner une estimation quantitative, fiable et reproductible de l'activité A13 en moins d'une heure **(65)**. Après avoir été validé sur de grandes cohortes de patients, il constitue désormais le test de référence mais il n'est pratiqué que dans certains centres experts **(153,154)**.

Par définition, l'activité d'A13 est inférieure à 5% chez les patients atteints de PTT. Lorsqu'un déficit est retrouvé chez un patient pour lequel on suspecte un PTT acquis, il est alors souhaitable de rechercher des anticorps anti-A13 par ELISA. Dans les tests commerciaux disponibles **(155)**, l'antigène immobilisé sur la plaque est l'A13 recombinante humaine, et la présence d'auto-anticorps IgG reconnaissant A13 est détectée. La recherche d'une activité inhibitrice de l'anticorps n'est pas pratiquée en routine dans la mesure où l'intérêt en pratique clinique reste limitée, même si elle ne consiste qu'à réaliser un nouveau test FRET en mélangeant le plasma du patient préchauffé à 56°C (afin de dissocier d'éventuels complexes immuns) avec celui de témoins sains afin d'observer s'il existe une diminution de l'activité d'A13.

Enfin, il existe la possibilité de mesurer la quantité d'A13 (antigénémie) par ELISA, mais étant donné la grande variabilité des niveaux d'A13 entre les patients et au cours de l'évolution de la maladie, la place de ces tests dans la démarche diagnostique reste à déterminer et ils sont peu utilisés en pratique courante **(156)**.

## 5) Traitement et pronostic

Constamment mortel en l'absence de traitement, le PTT requiert, dès le diagnostic suspecté, un traitement lourd, urgent, basé sur l'administration de plasma par l'intermédiaire d'échanges plasmatiques (EP). Cette procédure permet d'apporter l'enzyme A13 déficitaire et d'extraire, en plus, les anticorps responsables de la maladie. De disponibilité réduite, les EP se déroulent souvent dans des services de soins intensifs, les multiples défaillances d'organes telles que coma, insuffisance rénale aiguë sévère, ischémie myocardique pouvant parfois faire nécessiter une ventilation mécanique, de la dialyse ou des catécholamines. Une corticothérapie est constamment associée **(157)**, exposant le patient à des complications infectieuses. La durée du traitement peut être de plusieurs semaines et malgré les progrès réalisés, cette maladie reste fatale dans 10 % à 20% des cas (137,158). Par ailleurs, la morbidité est lourde avec un risque de séquelles rénales et neurologiques ; à long terme, le risque de mort prématurée est plus important **(159)**.

Dans les cas résistants au traitement par échanges plasmatiques et corticoïdes, des traitements immunosuppresseurs de seconde ligne sont employés tels que le rituximab, le cyclophosphamide ou la vincristine. Dans les formes les plus graves, des échanges plasmatiques biquotidiens peuvent être proposés. De plus, des rechutes s'observent dans environ 30 à 60% des cas ; elles exposent les patients aux mêmes complications qu'à la phase initiale de la maladie (137,158).

Le rituximab, anticorps ciblant les lymphocytes B via leur molécule de surface CD20, est utilisé dans plusieurs situations **(160)**. A la phase initiale de la maladie, il permet de réduire le nombre d'échanges plasmatiques et la durée d'hospitalisation en favorisant une remontée

plaquettaire plus rapide **(161,162)**. Dans les PTT réfractaires, le rituximab permet d'obtenir un taux de rémission dans environ plus de 80% des cas (163–165). Le rituximab est également administré dans le but de prévenir les rechutes. Ainsi, lorsque les patients le reçoivent pendant la phase initiale de la maladie, le taux de rechutes à court terme est faible : inférieur à 15% à 24 mois, mais au long cours, on retrouve un taux similaire aux patients non traités, d'environ 30% **(166,167)**. Aussi, des perfusions répétées « préemptives » de rituximab sont proposées de manière croissante chez les patients en rémission, en particulier lorsqu'ils présentent dans leur suivi, une baisse de l'activité A13 et la persistance d'anticorps antiA13 détectables, qui sont des situations à haut risque de rechute. Cette stratégie, permet de diminuer le nombre de rechutes en comparaison à des sujets non traités **(168)** mais elle nécessite encore d'être évaluée sur une période de temps suffisante afin de déterminer plus précisément les conséquences possibles à long terme.

Par ailleurs, plus récemment, de nouvelles thérapeutiques ont été utilisées avec efficacité dans la phase aigüe de la maladie en ciblant les interactions entre le facteur Willebrand et les plaquettes (caplacizumab).

Au total, la prise en charge de ces patients est complexe et difficile et les facteurs prédictifs de la gravité, de la réponse au traitement et de la survenue de rechutes restent mal connus. Le profil évolutif de la maladie suggère cependant qu'il s'agit d'une maladie auto-immune chronique nécessitant un suivi au long cours et parfois un traitement prolongé.

## D. Aspects immunologiques du PTT

A ce jour, les mécanismes responsables de la synthèse des anticorps anti-A13, en particulier ceux impliqués dans la rupture de la tolérance immunitaire vis-à-vis de l'A13 endogène sont mal compris. Les principales études immunologiques réalisées ont porté sur la caractérisation de la réponse B.

### 1) Etude des lymphocytes B et épitopes B

Les différentes sous-populations lymphocytaires B présentes chez 36 patients atteints de PTT acquis en rémission ont été comparées à des témoins appariés sur l'âge et le sexe **(169)**. La proportion moyenne de lymphocytes B totaux ( $CD19^+$ ) était significativement plus importante chez les patients ( $13\pm6\%$  versus  $10\pm3\%$  pour les témoins,  $p = 0,007$ ). Cependant seuls 50% des patients avaient des anticorps spécifiques anti-A13 au moment de l'étude, dont 4 avec une activité  $A13 < 10\%$  et il n'était pas observé de différence entre les patients n'ayant jamais fait de rechute ( $n=16$ ) et les patients « rechuteurs » ( $n=20$ ).

Concernant les lymphocytes B « mémoires » ( $CD19^+CD27^+$ ), on ne retrouvait pas de différence entre témoins et patients mais parmi les patients, ceux avec rechute avaient une proportion de lymphocytes  $CD19^+CD27^+$  significativement plus importante que les patients sans rechute (rechuteurs :  $59\pm15\%$  versus  $44\pm14\%$  pour les non rechuteurs,  $p = 0,005$ ). Ces résultats suggèrent que le risque de rechute serait augmenté en cas d'augmentation du taux de lymphocytes B  $CD19^+CD27^+$ . Enfin, les fréquences des différentes sous-populations de lymphocytes  $CD19^+CD27^+$  ( $IgD^+IgM^+$ ,  $IgD^+IgM^-$ ,  $IgD^-IgM^+$ ,  $IgD^-IgM^-$ ) n'étaient pas significativement différentes des contrôles.

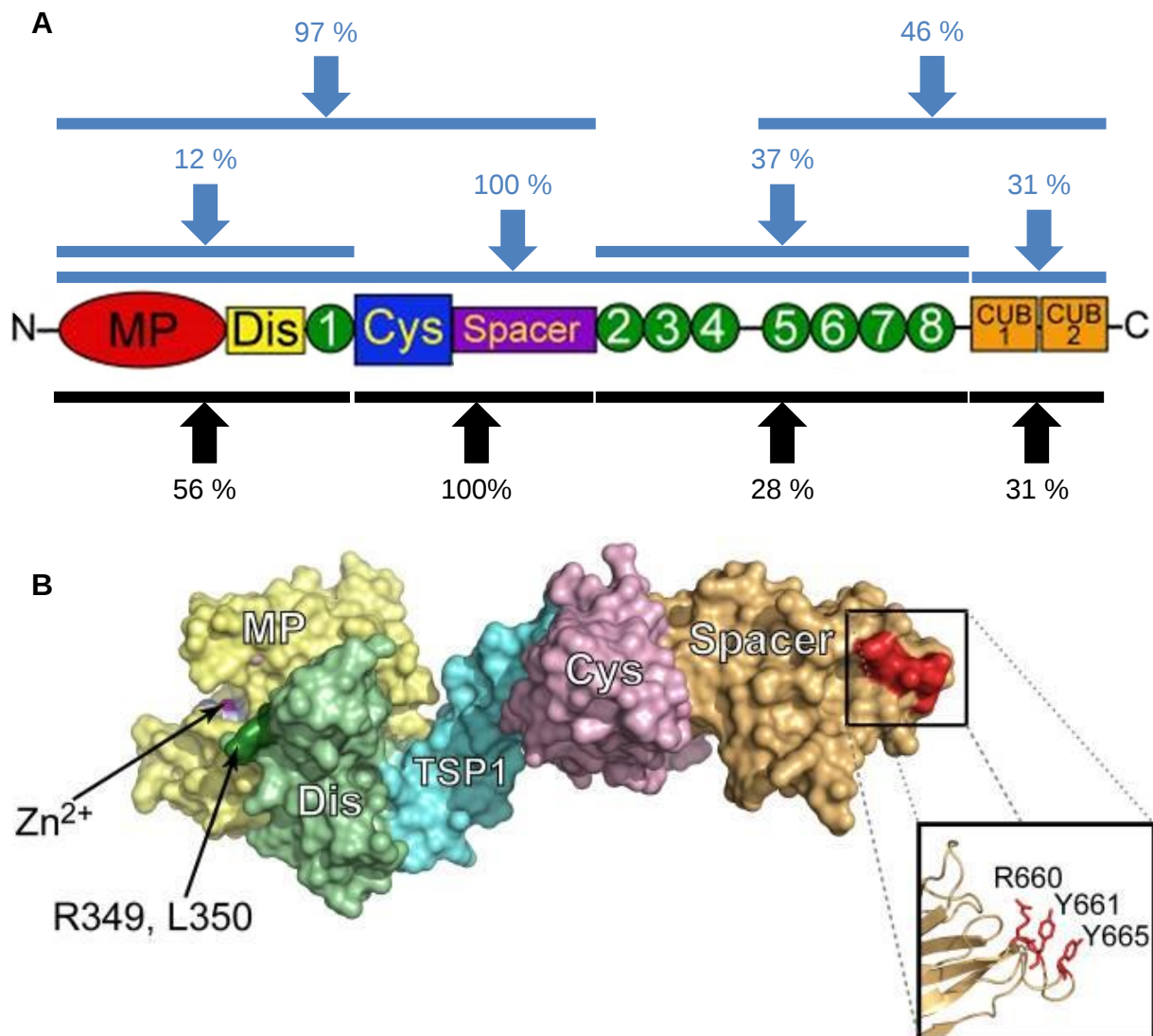
Récemment, il a été montré que des lymphocytes B mémoires spécifiques d'A13 sont localisés dans la rate de patients atteints de PTT acquis. Ces lymphocytes expriment des immunoglobulines anti-A13 dont les motifs CDR3 (complementarity determining region 3) de la chaîne lourde sont uniques et récurrents, suggérant un réarrangement des gènes d'immunoglobuline secondaire à une réponse immunitaire spécifique anti-A13 **(170)**.

Les premiers anticorps anti-A13 et leur pouvoir pathogène ont été identifiés dès 1998, avant même la découverte d'A13 (17–19). Ils sont polyclonaux, de type IgG dans près de 90 % des cas. Plus rarement, ces IgG anti-A13 sont associés à la présence d'IgM ou IgA anti-A13 **(171,172)**.

Parmi les sous-classes d'IgG, les IgG4 sont les plus fréquemment retrouvées (90% des cas), puis viennent les IgG1 (52-76%) et enfin les IgG2 et 3 pour environ 30 à 50% des cas (172–174). Il n'a pas été retrouvé de corrélation claire entre la sous-classe des IgG et la sévérité de la maladie à la phase aiguë, mais un taux d'IgG4 plus élevé a été retrouvé chez les patients en rechute, ce qui pourrait constituer un facteur de risque de rechute. Il a été montré que des hyper-mutations somatiques étaient présentes dans les gènes codant les domaines variables des anticorps anti-A13 de type IgG1/4, suggérant une maturation des lymphocytes B après rencontre avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques anti-A13 **(175)**. Par ailleurs, le gène codant pour la chaîne lourde V<sub>H</sub> des anticorps anti-A13 possède un segment 1-69 présentant des similitudes avec le domaine hémagglutinine du virus de la grippe, dont la signification est peu claire chez les patients, mais ce qui pourrait être le signe d'une réaction immunitaire croisée causant la perte de tolérance vis-à-vis d'A13 **(176)**.

Ces anticorps reconnaissent de façon constante un épitope B immunodominant localisé au niveau du domaine riche en cystéine et du domaine spacer d'A13. Plus précisément, la région

située au niveau des acides aminés Arg660 Tyr661 et Tyr665 dans le domaine spacer (Figure 6) formerait avec les résidus Arg568 et Phe592 du domaine « riche en cystéine », un relief structurel saillant (ou « exosite ») à la surface de la protéine, accessible et reconnu par les anticorps (78,177–179). Cette région correspond à un des sites de fixation d'A13 avec le domaine A2 du FW, ainsi, les anticorps antiA13 reconnaissant ce domaine inhiberaient le clivage des multimères de FW en limitant les interactions entre A13 et FW **(77)**. Par ailleurs, d'autres études ont montré la présence d'anticorps dirigés contre d'autres domaines d'A13, en particulier les domaines C terminaux TSR 5-8 et CUB1/2 **(180,181)**, mais souvent, les patients possédaient également des anticorps reconnaissant le domaine spacer.



**Figure 6 : Epitopes B d'ADAMTS13.**

**Partie A :** Les segments d'ADAMTS13 reconnus par les anticorps issus de patients sont indiqués par des flèches, en bleu, d'après Zheng *et al.* (n= 67 patients) et en noir, d'après Klaus *et al.* (n = 25 patients). Source : (180,181)

**Partie B :** Cette représentation de la portion N-terminale d'ADAMTS13, issue de sa cristallisation, montre le domaine métalloprotéase (MP, en jaune), le domaine de type désintégrine (Dis; en vert), le premier domaine thrombospondine de type 1 (TSP1, en bleu), le domaine riche en cystéine (Cys, en violet) et le domaine spacer, (Spacer, en beige). Les résidus Arg660, Tyr661 and Tyr665 sont exposés à la surface du domaine spacer, ils sont reconnus par la majorité des anticorps présents chez les patients atteints de PTT (n = 6). Le site catalytique est indiqué par des flèches. Source : (78)

Sur le plan fonctionnel, deux types d'auto-Ac anti-A13 ont été décrits : des anticorps « inhibiteurs », bloquant l'activité catalytique d'A13 et des anticorps « non neutralisants », qui se lient à A13 et accélèrent ainsi sa clairance de la circulation sanguine **(171,173,182,183)**. Des complexes immuns circulants anticorps/A13 ont d'ailleurs été détectés dans le plasma de certains patients, et ils seraient associés à un plus grand risque de rechute **(184)**.

Ces deux mécanismes sont responsables d'un déficit sévère de l'activité d'A13 et ils coexistent très souvent chez les patients atteints de PTT acquis. Ils peuvent être mesurés soit par ELISA, soit par des tests fonctionnels. Globalement, une IgG inhibitrice anti-A13 est retrouvée dans près de 80% des PTT acquis avec déficit fonctionnel sévère en A13 lors des poussées. Il a également été décrit une activité inhibitrice du plasma chez certains patients, sans que les tests ELISA n'aient pu identifier d'anticorps anti-A13 de type IgG et IgM **(172,173)**, cette situation étant difficile à interpréter.

Une étude récente **(185)** a démontré que les anticorps inhibiteurs sont spécifiques du domaine spacer alors que ceux reconnaissant l'extrémité C-terminale ou les autres domaines de la partie N-terminale n'ont pas ou peu d'activité inhibitrice. Dans cette étude, il est suggéré que le déficit d'activité A13 retrouvé chez les patients atteints de PTT acquis est davantage provoqué par la clairance de la protéine que par l'activité inhibitrice des anticorps. La quantité d'A13 mesurée par ELISA (antigénémie) serait plus basse lorsque l'anticorps est dirigé contre l'extrémité C-terminale d'A13, et constituerait un facteur pronostique de la maladie.

Ces anticorps surviennent de manière transitoire et disparaissent le plus souvent sous traitement, lors de la rémission clinique, parallèlement à une normalisation de l'activité d'A13. Chez certains patients cependant, malgré la rémission clinique, ces auto-anticorps persistent avec, parallèlement, une activité d'A13 qui reste indétectable. Cette situation expose le patient à un risque important de rechute d'environ 40% à 60% au cours des deux

ans après la première poussée, et probablement 100% à long terme. Un titre élevé d'anticorps au diagnostic serait également prédictif de rechute **(186)**. Il a également été constaté une augmentation possible du titre des anticorps anti-A13 lors de la phase initiale du traitement sous échanges plasmatiques, qui se traduit dans 30% à 50% des cas par une exacerbation des symptômes.

Par ailleurs, chez certains patients atteints de PTT acquis, les anticorps anti-A13 sont associés à d'autres auto-anticorps, notamment des facteurs anti-nucléaires. L'apparition des autres auto-anticorps peut survenir d'emblée ou après quelques mois, voire des années de suivi. Aussi, des anticorps anti-A13 de type IgM et IgG ont été retrouvés chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique (18% et 13% respectivement) ou de syndrome des anti-phospholipides (18% et 5% respectivement), sans que ces patients n'aient eu de PTT. Dans cette étude **(173)**, l'activité A13 était normale chez ces patients et des anticorps anti-A13 ont été également retrouvés chez 4% des individus sains testés.

## 2) PTT et autres manifestations auto-immunes

Le PTT acquis est fréquemment associé à d'autres maladies auto-immunes **(135,187)**. En particulier, l'association au lupus érythémateux systémique (LES) a été décrite précocement, avant même la découverte d'A13 **(188)**, mais elle reste rare (<4% des PTT). Cette association semble, en revanche, plus fréquente chez l'enfant (jusqu'à 26% des PTT) **(189)**. De manière plus générale, le PTT est associé dans près de 20% des cas à des manifestations auto-immunes ou évocatrices d'auto-immunité, comme un tableau de polyarthrite chronique non destructrice, des lésions de lupus cutané, un syndrome de Raynaud ou des endocrinopathies auto-immunes. Enfin, on retrouve souvent des antécédents familiaux de maladie auto-immune.

Différents auto-anticorps peuvent être observés dans le PTT acquis. Des anticorps antinucléaires sont retrouvés chez 30 à 50% des patients **(135)** et des auto-anticorps dirigés contre la glycoprotéine membranaire CD36 (ou glycoprotéine IV) ont été mis en évidence dans 60 à 85% des cas de PTT **(190,191)**. Cette protéine se situe à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales (particulièrement celles de la microcirculation). De manière intéressante, les anticorps anti-CD36 ont la propriété d'induire une activation plaquettaire et leur agrégation **(192)**. Enfin, le CD36 peut fixer A13 via les domaines TSR, on peut donc supposer que les auto-anticorps anti-CD36 pourraient altérer l'activité *in vivo* d'A13, en inhibant l'ancrage de celle-ci à la surface de l'endothélium, et ainsi empêcher sa colocalisation avec les multimères de FW **(98)**. Cependant, cette hypothèse séduisante n'a pas été validée *in vitro* et le rôle direct des anticorps anti-CD36 dans la physiopathologie du PTT acquis reste incertain. Comme les anticorps antinucléaires, ils pourraient n'être finalement que l'un des multiples témoins du contexte auto-immun existant dans le PTT.

### 3) Liens entre infections, complément et PTT

La survenue d'un PTT acquis, est favorisée par certaines conditions physiopathologiques (maladie auto-immune, grossesse, infection par le VIH,...). Une variation saisonnière a été observée avec, dans une série d'une centaine de cas aux Etats-Unis, davantage de cas survenus pendant l'été, suggérant l'influence d'un facteur environnemental **(193)**. Plusieurs études suggèrent que les infections jouent un rôle important dans le déclenchement de la maladie (194–199), à la fois lors de la poussée inaugurale et lors des rechutes **(200)** ; de nombreux agents infectieux ont été retrouvés chez des patients.

Une étude récente, portant sur 280 patients, a montré que dans environ 40% des cas (n=114), il existait des symptômes compatibles avec une infection au moment de la survenue d'un épisode de PTT acquis **(201)**. Un agent infectieux était identifié dans 34 cas, il s'agissait principalement de Bacilles Gram négatifs. La présence d'une infection n'avait pas de conséquence sur le pronostic du PTT. Dans une autre étude portant sur 54 patients atteints de microangiopathie thrombotique, les infections constituaient un facteur de bon pronostic pour la survie. Cependant, dans cette étude, le dosage d'A13 n'était pas disponible et seuls 10 des 24 patients ayant une présentation clinique compatible avec un PTT acquis, avaient une documentation microbiologique **(202)**.

Le rôle des infections dans la survenue de la maladie pourrait passer par une activation endothéliale, ce qui conforterait l'hypothèse d'un déclenchement de la maladie en deux évènements, comme pour le modèle murin. Cette activation de l'endothélium paraît être non spécifique, d'origine inflammatoire et conduit au relargage de méga-multimères de FW. Cependant, il a été montré récemment que les taux plasmatiques de myéloperoxydase, libérée

par les polynucléaires neutrophiles activés, comme par exemple lors d'un épisode infectieux, étaient augmentés à la phase initiale du PTT **(203)**. La myélopéroxydase pourrait alors avoir un effet direct inhibiteur sur A13, par un mécanisme oxydatif, comme cela a été démontré *in vitro* **(95)**. Il a également été décrit que le plasma de patients atteints de PTT était capable d'induire l'apoptose de cellules endothéliales de la microcirculation, via un mécanisme impliquant la voie Fas/Fas-Ligand **(204)**. Néanmoins dans cette étude relativement ancienne, le dosage d'A13 n'était pas réalisé et les diagnostics de PTT acquis sont donc incertains.

D'autres auteurs ont évoqué le rôle du complément dans la survenue des lésions endothéliales **(205)**, indépendamment ou non d'une infection, avec des taux sanguins plus élevés de C3a et de C5a chez des patients atteints de PTT acquis à la phase aiguë (n=20) en comparaison aux patients en rémission (n=49,  $p<0,001$ ) **(206)**. Dans cette dernière étude, les taux sanguins d'IL10 et d'IL6 étaient significativement plus élevés chez les patients en phase aiguë en comparaison aux patients en rémission ; de plus, le taux d'IL10 était corrélé au taux de C3a ( $r=0,692$ ,  $p=0,006$ ). Cette élévation du C3a a également été retrouvée dans une cohorte de 33 patients atteints de PTT acquis, tout comme une augmentation du complexe C5b9 soluble en comparaison à des témoins **(207)**. De plus, une diminution du C3 était retrouvée chez 15% des patients à la phase aiguë, témoignant d'une consommation du complément par la voie alterne. Dans cette étude, la persistance des anticorps inhibiteurs anti-A13 en rémission était associée à une augmentation de l'activation du complément. Enfin, dans une autre étude chez 28 patients, l'augmentation de l'activation du complément serait associée au niveau de sévérité de la maladie et constituerait ainsi un facteur de risque de mortalité **(208)**.

Une autre hypothèse permettant de d'expliquer le rôle des infections dans la survenue du PTT acquis serait une réaction immunitaire croisée avec un mimétisme moléculaire entre A13 et un agent pathogène **(209)**.

Au total, si l'importance des facteurs environnementaux reste encore à déterminer avec précision, le PTT survient chez des individus présentant des facteurs de susceptibilité génétique. Dans ce sens, certains gènes de susceptibilité ont récemment été identifiés.

#### 4) Restriction HLA

Parmi les facteurs génétiques pouvant influencer la survenue d'une maladie auto-immune, l'haplotype HLA (Human Leucocyte Antigen) est le principal facteur retrouvé dans de nombreuses pathologies **(210)**. En effet, les cellules présentatrices d'antigène initient la réponse immunitaire anti-A13 en présentant la protéine endocytée aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> via les molécules HLA de classe II. Ainsi, trois études ont montré que le PTT acquis est associé à certains allèles du système HLA (211–213).

Ces études, portant au total sur 165 patients, ont toutes retrouvé que l'allèle DRB1\*11, et dans une moindre mesure DQB1\*03, constituait un facteur de risque pour la survenue de PTT acquis (*odds ratio* à 5,63 pour DRB1\*11, IC95% : 2,87-11,1). A l'inverse, d'autres allèles comme DRB1\*04 semblent être protecteurs vis-à-vis de la maladie (Tableau 3).

De manière intéressante, en 1994, alors que la physiopathologie du PTT était encore largement inconnue, une étude américaine portant sur 30 patients atteints de probable PTT acquis, avait retrouvé que l'HLA-DR53, dont le gène DRB4 est lié au gène DRB1\*04, constituait un facteur protecteur **(214)**. Les patients étaient caucasiens pour 21 d'entre eux et seuls 2/30 étaient DR53 contre 57% chez les témoins ( $p < 0.0005$ ), soit un risque relatif de 0,09 (IC95% : 0.01-0.28).

D'autres facteurs génétiques peuvent être impliqués, comme en témoigne la survenue de PTT acquis à un an d'intervalle, chez 2 sœurs jumelles qui étaient porteuses de l'allèle HLA-DQB1\*03, mais non DRB1\*11 **(215)**. Aussi, cet allèle a été retrouvé dans une plus grande proportion chez les patients atteints de PTT, en particulier lorsqu'ils ne sont pas porteurs de l'allèle HLA-DRB1\*11.

| Etude                         | Pays        | Patients | HLA à risque                                                                                                                                    | HLA protecteur                                                                                |
|-------------------------------|-------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Coppo <i>et al.</i><br>(211)  | France      | 61       | <b>DRB1*11 :</b><br>62% vs 23% - $p=10^{-7}$<br><br><b>DQB1*03 :</b><br>77% vs 54% - $p=0,006$                                                  | <b>DRB1*04 :</b><br>10% vs 28% - $p=0,05$                                                     |
| Scully <i>et al.</i><br>(212) | Royaume-Uni | 50       | <b>DRB1*11 :</b><br>44% vs 12% - $p=0,0024$<br><br><b>DRB3 :</b><br>84% vs 58% - $p=0,024$<br><br><b>DQB1*03:01 :</b><br>58% vs 34% - $p=0,048$ | <b>DRB1*04 :</b><br>10% vs 35% - $p=0,0096$<br><br><b>DRB4 :</b><br>26% vs 61,5% - $p=0,0024$ |
| John <i>et al.</i><br>(213)   | Allemagne   | 54       | <b>DRB1*11:</b><br>48% vs 23% - $p=0,003$<br><br><b>DQB1*02:02 :</b><br>20% vs 1,2% - $p<0,001$                                                 | <b>DRB1*04 :</b><br>7,4% vs 24,6% - ns                                                        |

**Tableau 3 :** Résultats des études d'association entre PTT et HLA.

Les pourcentages exprimés correspondent à ceux retrouvés chez les patients versus ceux retrouvés chez les contrôles.

Au total, cette restriction HLA observée dans le PTT confirme l'importance d'une aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la production d'IgG ayant subi une maturation d'affinité. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pourraient avoir un rôle dans la rupture de la tolérance vis-à-vis d'A13.

## 5) Etudes des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et épitopes T

Le fait qu'il existe une restriction HLA et que les anticorps anti-A13 soient d'isotype IgG en aient subi des hyper mutations somatiques ; suggère fortement la nécessité d'une intervention des lymphocytes T dans l'apparition de la maladie. Cependant, la réponse immunitaire T anti-A13 n'a été que très peu étudiée et les propriétés des lymphocytes T impliqués dans la pathogénèse du PTT sont inconnues.

Une seule étude s'est intéressée aux populations lymphocytaires T présentes chez les patients atteints de PTT acquis **(169)**, elle ne concernait que les lymphocytes T régulateurs. Une augmentation significative de la proportion moyenne de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> circulants a été observée chez les patients (n=36), en comparaison à des témoins appariés sur l'âge et le sexe : 33%±10 vs 28%±10, p=0,04. Cette augmentation était plus importante chez les patients n'ayant jamais fait de rechute (n=16) en comparaison avec les patients « rechuteurs » (n=20) : 38%±7 vs 29%±10 respectivement, p=0,01. Cependant, cette étude ne concernait que des malades en rémission, avec une mesure réalisée après un délai médian de 23 mois (10-48) après le dernier épisode aigu. De plus, les proportions de lymphocytes T régulateurs circulants (définis par le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>bright</sup> et CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) n'étaient pas significativement différentes. Les conclusions de cette étude sont donc difficiles, d'autant plus qu'une autre série non publiée (abstract ISTH 2011- McDonald *et al.*), portant sur 50 patients, apportait des conclusions contradictoires. Les taux médians de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> totaux et de lymphocytes T régulateurs circulants (définis par le phénotype CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>bright</sup> et CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) seraient similaires chez les patients à la phase aiguë (n=10) comparés aux patients en rémission (n=40).

Une des étapes indispensables à l'étude des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'A13 est l'identification des peptides dérivés d'A13, couplés aux molécules HLA de classe II. Les complexes HLA-peptides sont reconnus par les récepteurs spécifiques des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (TcR) à l'origine de la réponse immunitaire dirigée contre A13.

En 2013, Sorvillo *et al.* ont identifié chez l'homme les peptides d'A13 présentés par les molécules HLA-DR11 (223). Pour cela, des MoDCs immatures issues de donneurs sains de différents allèles HLA-DR ont été incubées pendant 5 heures avec différentes doses d'A13 recombinante humaine. Ces cellules ont été ensuite stimulées pendant 24 heures avec du lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL) pour achever leur maturation puis elles ont été lysées et les molécules HLA-DR associées aux peptides issus d'A13 ont été immunoprécipitées avec un anticorps monoclonal (L243) anti-HLA-DRα couplé avec la protéine A-sépharose. Les peptides ont été ensuite élués et leur séquence a été analysée par spectrométrie de masse.

Pour les donneurs HLA-DR11 (n=6), lorsque les MoDCs ont été chargées avec une dose de 100 nM d'A13 (n=4) ou de 500 nM (n=4), plusieurs peptides dérivant de la même séquence centrale (ou « core ») FINVAPHAR ont été retrouvés. Cette séquence de 9 acides aminés est située au niveau des résidus 1328-1336, dans le domaine CUB2.

Chez les donneurs ayant d'autres allèles HLA (n=4), aucun peptide n'a été retrouvé en utilisant une dose d'A13 de 100 nM chez 2 donneurs, et pour deux autres donneurs ayant en commun l'HLA DR3, des peptides dérivant de la séquence SYILIRDTHSLRT ont été identifiés. Cette séquence de 13 acides aminés est située en position 1356-1368, dans le domaine CUB2. A la dose de 500 nM, d'autres peptides ont été retrouvés, provenant principalement des domaines CUB1 et CUB2 mais aussi des domaines désintégrine, TSR6, métalloprotéase et spacer.

Les auteurs concluent qu'en présence de l'HLA-DR11, seuls les peptides issus de la séquence « core » 1328-1336 sont présentés, quelle que soit la dose d'A13. Pour les autres HLA, la composition des peptides présentés serait variable, avec cependant une prédominance de peptides issus des domaines CUB1 et CUB2. Cette séquence dépendrait de la dose d'A13 mise en présence des MoDCs, avec pour la plus faible dose de 100nM, la seule séquence « core » 1356-1368, pour l'HLA-DR3 (bien qu'il ne soit pas exclu que ce peptide soit présenté par DR15 ou DR13, autres allèles HLA des donneurs testés).

Une autre interprétation de leurs résultats consiste à proposer qu'à partir de 17 donneurs sains, couvrant 7 HLA différents (DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR15), A13 est présentée sous forme de peptides dérivant de onze séquences peptidiques « core » issues principalement des domaines CUB1 et CUB2. En particulier, la séquence peptidique « core » située en position 1328-1336, serait partagée au sein de ces HLA et exclusive pour l'HLA-DR11 (Tableau 4).

| Séquence « core » | Localisation | Domaine         | HLA-DR retrouvés    |                                                       |
|-------------------|--------------|-----------------|---------------------|-------------------------------------------------------|
|                   |              |                 | A13 à 100nM         | A13 à 500nM                                           |
| LLRDPSLGA         | 114-122      | Métalloprotéase |                     | DR4, DR13                                             |
| LLSLLAGR          | 271-278      | Désintégrine    |                     | DR3, DR15                                             |
| LFTHLAVRI         | 591-599      | Spacer          |                     | DR7, DR15                                             |
| ILLDTQCQG         | 989-997      | TSR6            |                     | DR3, DR4                                              |
| LEPTGTIDM         | 1197-1205    | CUB1            |                     | DR7, DR15                                             |
| DMLLLWGRLTWRK     | 1240-1252    | CUB1            |                     | DR4, DR13                                             |
| VLLRYGSQLA        | 1282-1291    | CUB1            |                     | DR15, DR3<br>DR7                                      |
| FINVAPHAR         | 1328-1336    | CUB2            | DR11, DR13,<br>DR15 | DR1, DR3,<br>DR4, DR7,<br><b>DR11</b> , DR13,<br>DR15 |
| IAIHALATNMG       | 1337-1347    | CUB2            |                     | DR3, DR4                                              |
| SYILIRDTHSLRT     | 1356-1368    | CUB2            | DR3, DR13,<br>DR15  | DR3, DR4,<br>DR13, DR15                               |
| FLKAQASLR         | 1394-1402    | CUB2            |                     | DR3, DR15                                             |

**Tableau 4 :** Peptides d'ADAMTS13 présentés par les molécules HLA-DR issues de MoDCs chargées avec différentes doses d'ADAMTS13, chez des donneurs sains d'HLA différents, d'après Sorvillo *et al.*.

Par ailleurs, de façon intéressante, des peptides issus du MMR (CD206), récepteur permettant la reconnaissance et l'endocytose d'A13 par les MoDCs, ont été également retrouvés. Cependant, on retiendra que cette étude n'a pas exploré la reconnaissance des complexes molécules HLA-peptides par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Il ne s'agit donc que d'une prédiction incomplète des épitopes T. De plus, cette étude ne concernait pas de patient, le nombre de donneurs sains était limité tout comme les différents types HLA testés.

## II – OBJECTIFS DU TRAVAIL

Nous avons vu que le PTT est une maladie auto-immune rare et grave caractérisée par la présence d'anticorps dirigés contre A13. Le développement de ces anticorps anti-A13 est le résultat d'une rupture de la tolérance vis-à-vis de l'A13 endogène. Elle est favorisée par des facteurs environnementaux et génétiques. L'étude de l'immunogénicité de la protéine montre qu'elle est endocytée après reconnaissance par un récepteur au mannose, et présentée aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par les cellules dendritiques. La restriction HLA-DR11 retrouvée chez les patients implique que la façon dont est présentée A13 aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> intervient dans cette rupture de tolérance. De même, l'isotype IgG des anticorps et la présence d'hypermutations somatiques dans les gènes codant les domaines variables des anticorps indiquent que les lymphocytes B ont subi une maturation sous le contrôle de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'A13. Les épisodes infectieux et le contexte inflammatoire retrouvés lors du déclenchement de la maladie rendent plausibles l'hypothèse d'une rupture de la tolérance par mimétisme moléculaire entre A13 et un agent pathogène. Cependant, les déterminants de la réponse immunitaire T CD4<sup>+</sup> anti-A13 ne sont pas connus. Seule une étude s'est intéressée aux peptides présentés aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mais les peptides effectivement reconnus par les TcR n'ont pas été déterminés.

**Dans ce travail, mon objectif est d'identifier les épitopes T d'A13 chez les patients atteints de PTT.** Leur analyse permet d'évaluer s'il existe des épitopes partagés entre différents allèles HLA et quelle est la singularité de l'HLA-DR11. De possibles différences entre les épitopes B et T ainsi que des différences entre des donneurs sains et les patients sont recherchées. Ces travaux nécessitent de développer des outils, notamment via l'utilisation d'un modèle murin humanisé pour le HLA-DR1, qui seront utiles pour l'étude des propriétés d'A13 et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques chez les patients.

### III – RESULTATS

#### A. Article 1 : Résumé

Dans ce travail (217), j'ai d'abord identifié les épitopes T d'ADAMTS13 pour la molécule HLA DRB1\*01:01 (DR1). J'ai analysé la séquence de la protéine A13 à l'aide du site web IEDB, qui découpe la protéine en peptides chevauchants de 15 acides aminés. Chaque peptide possède une séquence « core » partagée de 9 acides aminés, pour laquelle un score prédictif d'affinité pour la molécule HLA DR1 est calculé. Une liste de 15 peptides, avec chacun une séquence « core » différente, a été identifiée comme ayant une forte probabilité de fixation.

J'ai alors évalué la capacité de fixation des peptides aux molécules HLA-DR1, par des tests ELISAs compétitifs. La concentration conduisant à un déplacement de 50% d'un peptide de référence ( $CI_{50}$ ) est comparée et indique l'affinité du peptide testé. A partir des 15 peptides identifiés *in silico*, j'ai déterminé que 5 peptides possèdent une  $CI_{50}$  meilleure que celle du peptide de référence (ratio <1) et 7 autres peptides possèdent une affinité significative (ratio  $CI_{50}$  <20).

Par ailleurs, j'ai immunisé avec de l'ADAMTS13 recombinante humaine, une souris humanisée transgénique pour l'HLA DR1 et invalidée pour le CMH de classe II murin. J'ai alors obtenu 26 lignées d'hybridomes T CD4+, spécifiques d'A13, sélectionnées sur leur capacité à sécréter de l'IL-2 après stimulation par des splénocytes murins en présence d'A13.

Les 12 peptides dérivés d'A13 ayant une forte affinité pour les molécules HLA DR1 ont alors été présentés aux hybridomes par des cellules présentatrices d'antigène artificielles HLA DR1, et seul le peptide 1239-1253 est reconnu et capable de stimuler les hybridomes T CD4+ spécifiques d'A13. Après analyses complémentaires, j'ai démontré que la séquence minimale de l'épitope reconnu par les hybridomes T CD4+ murins est le peptide central <sup>1241</sup>MLLLWGRLTWR<sup>1251</sup>. Ce peptide est localisé dans le domaine CUB1 d'ADAMTS13 et

j'ai vérifié qu'il était effectivement apprêté et présenté par des cellules dendritiques humaines (MoDCs) issues de donneurs sains DR1.

De plus, lors de tests de stimulation par incorporation de thymidine tritiée radioactive, il a montré sa capacité à induire la prolifération des splénocytes et des leucocytes ganglionnaires de souris transgéniques DR1, immunisées avec de l'ADAMTS13.

Par la suite, j'ai généré des lignées lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> humaines, après stimulation par l'ensemble des peptides sélectionnés, de cellules mononucléées du sang circulant, de patients atteints de PTT acquis et de donneurs sains avec HLA connu (DR1 et DR11). Après 10 jours de culture selon le protocole acDC, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sécréteurs d'Interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) en réponse à l'ensemble des peptides, étaient amplifiés de façon non spécifique pendant 3 semaines. Un test ELISPOT détectant la sécrétion d'IFN- $\gamma$  en réponse à une stimulation par les peptides était alors réalisé sur ces lignées et j'ai ainsi déterminé que le peptide 1239-1253 d'A13 était reconnu par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> d'un patient DR1 ; tout comme le peptide 1392-1406.

De plus, l'évaluation par IEDB montre que le peptide 1239-1253 posséderait une bonne affinité pour différents HLA DR, ce qui est confirmé par d'autres tests ELISA compétitifs concernant DR11 et DR15. L'analyse des lignées lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> d'un donneur sain DR11 et de 2 patients DR11 au diagnostic et en rémission, révèle que le peptide 1239-1253 est capable d'être présenté et reconnu chez les 3 individus.

Ainsi, ce peptide apparaît comme étant le peptide immunodominant d'ADAMTS13, l'exploitation de ces résultats permet d'envisager la caractérisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques chez les patients atteints de PTT acquis.

## **The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitope**

Laurent Gilardin<sup>1,2,3,4,\*,#</sup>, Sandrine Delignat<sup>1,2,3</sup>, Ivan Peyron<sup>1,2,3</sup>, Mathieu Ing<sup>1,2,3</sup>, Yu-Chun Lone<sup>5</sup>, Bagirath Gangadharan<sup>1,2,3</sup>, Baptiste Michard<sup>1,2,3</sup>, Yousra Kherabi<sup>1,2,3</sup>, Meenu Sharma<sup>1,2,3</sup>, Anastas Pashov<sup>1,2,3,6</sup>, Jean-Baptiste Latouche<sup>7</sup>, Mohamad Hamieh<sup>7</sup>, Olivier Toutirais<sup>8</sup>, Pascale Loiseau<sup>9</sup>, Lionel Galicier<sup>10</sup>, Agnès Veyradier<sup>11</sup>, Srinu Kaveri<sup>1,2,3,12</sup>, Bernard Maillère<sup>13</sup>, Paul Coppo<sup>4,14</sup>, Sébastien Lacroix-Desmazes<sup>1,2,3,12</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR S) 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe Immunopathology and Therapeutic Immunointervention, Paris, France ;

<sup>2</sup> Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie–Paris 6, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe Immunopathology and Therapeutic Immunointervention, Paris, France ;

<sup>3</sup> Université Paris Descartes – Paris 5, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe Immunopathology and Therapeutic Immunointervention, Paris, France ;

<sup>4</sup> Centre National de Référence sur les Microangiopathies Thrombotiques, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Paris, France ;

<sup>5</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France;

<sup>6</sup> Department of Immunology, Institute of Microbiology, BAS, Sofia, Bulgaria ;

<sup>7</sup> Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Ch.NICOLLE, Rouen, France ;

<sup>8</sup> Laboratoire d'Immunologie and d'Immunopathologie, CHU Caen, Caen, France ;

<sup>9</sup> Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France ;

<sup>10</sup> Département d'Immunologie Clinique, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France ;

<sup>11</sup> Service d'hématologie biologique, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Paris, France ;

<sup>12</sup> International Associated Laboratory IMPACT (INSERM, France–Indian Council of Medical Research, India), National Institute of Immunohaematology, Mumbai, India ;

<sup>13</sup> Institute of Biology and Technologies, SIMOPRO, Labex LERMIT, Labex VRI, Commissariat à l'énergie atomique (CEA) Saclay, Gif sur Yvette, France ;

<sup>14</sup> Service d'Hématologie, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Paris, France.

\* Corresponding author : Laurent GILARDIN, # Current affiliation : Service d'onco-hématologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, 75010 Paris, France, gilardin@gmail.com.

## ABSTRACT

Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura is a rare and severe disease characterized by auto-antibodies directed against "A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeats, 13th member" (ADAMTS13), a plasma protein involved in hemostasis. The implication of CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of the disease is suggested by the IgG isotype of the antibodies. However, the nature of the CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes remains poorly characterized. Here, we determined the HLA-DR-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes of ADAMTS13. Candidate T-cell epitopes were predicted *in silico* and binding affinities was confirmed in competitive ELISA. ADAMTS13-reactive CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas were generated following immunization of HLA-DR1 transgenic mice (Sure-L1 strain) and used to screen the candidate epitopes. We identified the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide as the single immunodominant HLA-DR1-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitope. The peptide is located in the CUB1 domain of ADAMTS13. It was processed by dendritic cells, stimulated CD4<sup>+</sup> T cells from Sure-L1 mice and was recognized by CD4<sup>+</sup> T cells from a HLA-DR1-positive patient with acute thrombotic thrombocytopenic purpura. Interestingly, the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide demonstrated promiscuity towards HLA-DR11 and HLA-DR15. Our work paves the way towards the characterization of the ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura using ADAMTS13<sup>1239-1253</sup>-loaded HLA-DR tetramers.

**Keywords:** ADAMTS13, TTP, T-cell epitope, HLA-DR1, T-cell hybridoma

## INTRODUCTION

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a rare and severe autoimmune disease characterized by the occurrence of IgG autoantibodies against the metalloprotease "A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeats, 13th member" (ADAMTS13).<sup>1-3</sup> ADAMTS13 cleaves multimers of von Willebrand factor (VWF), a glycoprotein involved in hemostasis. Inhibition of ADAMTS13 by IgG leads to an accumulation of hyper-adhesive VWF multimers causing microthrombi that occlude the lumen of the capillaries in the microcirculation, thus inducing red cell hemolysis and down-stream organ ischemia. TTP is thus characterized by a combination of microangiopathic hemolytic anemia, peripheral thrombocytopenia and organ failure of variable severity with typically neurological involvement.<sup>4</sup>

The physiopathological mechanisms underlying TTP and responsible for the synthesis of anti-ADAMTS13 antibodies, and particularly the mechanisms involved in the loss of tolerance of the immune system towards ADAMTS13, are poorly understood. Polyclonal anti-ADAMTS13 antibodies are directed against different domains of ADAMTS13.<sup>5</sup> In most patients, anti-ADAMTS13 antibodies are of the IgG isotype with a predominance of the IgG<sub>4</sub> subclass.<sup>6</sup> IgG from all patients recognize immunodominant B-cell epitopes located in the spacer domain of ADAMTS13.<sup>7</sup> The B-cell epitopes have been proposed to be located between the 660-661 and 665 amino-acids.<sup>8</sup> The fact that anti-ADAMTS13 antibodies are of the IgG isotype, of high affinity and have undergone affinity maturation, strongly suggests the requirement of a CD4<sup>+</sup> T-cell help in the development of the disease.<sup>9</sup> Besides, the HLA-DRB1\*11 (DR11) haplotype was independently identified as a strong risk factor by three

research groups.<sup>10–12</sup> However, while CD4<sup>+</sup> T cells are thought to play a major role, the specificity and the properties of the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes involved in the pathogenesis of TTP have not been studied. Importantly, the HLA restriction hints at the existence of immuno-dominant peptides in ADAMTS13.

Naive CD4<sup>+</sup> T-cell activation is initiated by the interaction of the T-cell receptor (TCR) with a peptide/MHC class II complex on professional antigen-presenting cells (APC). Extracellular antigens are endocytosed, degraded into peptides in the early endosome and loaded onto MHC class II  $\alpha\beta$  heterodimer molecules. Sorvillo *et al.* identified, through mass spectrometry, ADAMTS13-derived peptides that are localized within the HLA-DR molecules expressed by dendritic cells derived from human monocytes (Mo-DCs) and incubated with ADAMTS13 *in vitro*.<sup>13</sup> The identified peptides belonged mainly to the CUB1 and CUB2 domains of ADAMTS13. The core sequence FINVAPHAR from the CUB2 domain was the only sequence detected for 6 donors with the DR11 haplotype among the 17 donors included in the study. In addition, the same group recently demonstrated that a peptide containing the FINVAPHAR amino-acid sequence is able to stimulate CD4<sup>+</sup> T cells from a HLA-DR11 TTP patient.<sup>14</sup> These studies did however not investigate the recognition of other peptides by CD4<sup>+</sup> T cells. To address this question, we focused on the HLA-DR1 haplotype for which a humanized transgenic HLA-DR1 mouse is available, and investigated the CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes for the HLA-DR1 allele. The identified epitopes were then studied in the context of the HLA-DR11 allele.

## **METHODS**

### **Peptides and antigen**

ADAMTS13-derived peptides were selected based on their binding capacity to HLA-DRB1\*01:01 molecules. HLA class II-binding predictions of human ADAMTS13 (GenBank reference: AAL11095.1) were made on November 10, 2011, using the Immune Epitope Database analysis resource consensus tool, on the dedicated website [www.iedb.org](http://www.iedb.org).<sup>15–17</sup> Strong HLA-DRB1\*01:01 binders were predicted *in silico* using overlapping 15-mer peptides that span the whole ADAMTS13 sequence. Altogether, 99 15-mer peptides were predicted to be strong binders to HLA-DRB1\*01:01 with binding scores below 10 (i.e., with a probability for being good binders greater than 90%). Some of the predicted peptides shared common HLA-DRB1\*01:01-binding core sequences (9-mer peptides). When considering only unique core sequences and after exclusion of two peptides located in the prodomain of ADAMTS13, the list came down to 15 9-mer core peptides (Table 1). The peptides were synthesized at greater than 80% purity (GL Biochem, Shanghai, China) and included the 9-mer core sequences with addition of the 3 residues from the N-terminal end and the 3 residues of the C-terminal end. Individual peptides were solubilized at 1 mg.mL<sup>-1</sup> in DMSO/water. Recombinant full-length human ADAMTS13 (rhADAMTS13) was a kind gift from Baxter (Vienna, Austria).<sup>18</sup>

### **HLA-peptide-binding assays**

HLA-DR molecules were purified from homozygous EBV cell lines by affinity-chromatography using the monomorphic mAb L243. The binding to HLA-DR molecules was assessed by competitive ELISA, using an automated workstation, as previously reported.<sup>19, 20</sup> Briefly, HLA heterodimers were incubated with a biotinylated indicator peptide and serial dilutions of competitor peptides. As reference, the unlabelled form of biotinylated reporter peptide was used as internal control. After

24 hr incubation at 37°C, samples were neutralized with 450 mM Tris HCl (pH 7.5) (Sigma, St Quentin-Fallavier, France), 0.3% BSA (Sigma), 1 mM n-dodecyl  $\beta$ -D-maltoside buffer (Sigma) and applied to 96-well MaxiSorp ELISA plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) coated with 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  L243. Bound biotinylated peptide was detected by streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (GE Healthcare, Saclay, France) and after adding 4-methylumbelliferyl phosphate substrate (Sigma). Emitted fluorescence was measured at 450 nm upon excitation at 365 nm. The peptide concentration that prevented binding of 50% of the biotinylated peptide ( $\text{IC}_{50}$ ) was evaluated. The sequence of the biotinylated reporter hemagglutinin (HA) peptide was  $^{306}\text{PKYVKQNTLKLAT}^{318}$ ; the mean  $\text{IC}_{50}$  values of the  $\text{HA}^{306-318}$  peptide for HLA DRB1\*01:01 and DRB1\*11:01 binding were 4.61 and 37.42 nM, respectively. For HLA DRB1\*15:01, the sequence of the reporter biotinylated peptide  $\text{A3}^{152-166}$  was  $^{152}\text{EAEQLRAYLDGTGVE}^{166}$  with an  $\text{IC}_{50}$  value of 41.46 nM. Means and standard errors of the means were calculated from three independent experiments. Binding data are estimated as relative affinities defined as the ratio of the  $\text{IC}_{50}$  of each individual peptide to the  $\text{IC}_{50}$  of the reference peptide. Peptides with relative affinities of 20 or less were considered as high binders to the HLA-DRB1 molecules and were retained for the rest of the study.

### **Human samples**

Heparinized blood from healthy donors (EFS, Ile-de-France, Créteil, France) or from TTP patients (French national reference centre for TMA, Prof. P. Coppo, St Antoine Hospital, Paris, France and Dr L. Galicier, St Louis Hospital, Paris, France) was obtained after written informed consent. The use of samples for research purposes has been approved by the ethical committee from Saint-Antoine Hospital

(Authorization n°04807/12/2005). Acquired TTP criteria were those previously reported,<sup>4</sup> and included a severe deficiency (<5% of normal activity) in ADAMTS-13 activity along with a detectable inhibitor and/or detectable serum antibodies as assessed by ELISA (Technozym R ADAMTS13 INH, Technoclone, Vienna, Austria; threshold positivity > 15 U mL<sup>-1</sup>).

### **Blood processing**

All blood samples were shipped at room temperature within 4 hr after drawing. HLA-DR screening was performed by molecular typing using the Olerup SSP HLA\*DR kit (Olerup SSP, Stockholm, Sweden) after DNA extraction from total blood (Qiagen, Vienna, Austria). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation on lymphocyte separation medium (PAA Laboratories GmbH, Les Mureaux, France) and immediately frozen in pooled human male AB serum containing 10% DMSO (Sigma).

### **Immunisation of mice**

HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II (IA  $\beta$ -/-  $\beta$ 2m-/-)-knockout mice (Sure-L1 mice) were 8-12 week-old.<sup>21</sup> Mice were immunized subcutaneously with 150  $\mu$ g of rhADAMTS13 in complete Freund's adjuvant (Sigma), and fifteen days later with 150  $\mu$ g rhADAMTS13 in incomplete Freund's adjuvant (Sigma). Blood was drawn by retro-orbital bleeding 4 days after the second administration of rhADAMTS13 and cells from the spleen and draining lymph nodes were collected. Animals were handled in agreement with local ethical authorities (Comité Régional d'Éthique p3/2005/002).

### **Titration of anti-ADAMTS13 IgG**

Antibodies against human ADAMTS13 were measured in mice serum using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). Briefly, ELISA plates were coated with rhADAMTS13 ( $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) for 1 hr at  $37^{\circ}\text{C}$  and subsequently blocked for an additional hour with PBS-1% BSA. Serum serially diluted in PBS-BSA (dilution factor: 1/3) was then incubated during 1 hr at room temperature. Bound IgG was revealed using a secondary horseradish peroxidase-coupled goat  $\text{F(ab')}_2$  anti-mouse IgG antibody (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) and substrate. The mouse monoclonal anti-human ADAMTS13 IgG mAb 20A5 (HYCULT, Uden, NL) was used as positive control.

### **HLA-DRB1\*01:01 positive antigen-presenting cells (APC)**

Three different sources of APCs were used for T-cell presentation assays: 1) purified splenocytes from Sure-L1 mice inactivated with mitomycin C ( $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , Sigma), 2) immature Mo-DCs from HLA-DRB1\*01:01 healthy donors inactivated with mitomycin C ( $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), or 3) artificial APCs derived from NIH-3T3 cell line expressing HLA-DRB1\*01:01 (AAPC<sup>DR1</sup>). To generate AAPC<sup>DR1</sup>, NIH-3T3 cells were transduced with the common HLA-DR $\alpha$  chain and the specific HLA-DR $\beta$ 1\*01:01 chain, and with the co-stimulatory and adhesion human molecules B7.1, ICAM-1 and LFA-3.<sup>22</sup> AAPC<sup>DR1</sup> does not produce murine IL-2 and therefore does not require inactivation with mitomycin C. Its ability to present and stimulate efficiently HLA-DRB1\*01:01-restricted CD4<sup>+</sup> T-cells has been demonstrated.<sup>22</sup> In the case of Mo-DCs, human monocytes were isolated from PBMCs using anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% human AB Serum (Sigma), L-glutamine and

antibiotics (Life Technologies - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the presence of 500 IU human recombinant interleukin 4 (IL-4, ImmunoTools, Friesoythe, Germany) and 1000 IU human recombinant GM-CSF (ImmunoTools) per  $10^6$  cells. After 5 days of culture, the non-adherent immature Mo-DC-enriched fraction was harvested and the immature status was confirmed by the expression of the following surface phenotypic markers: CD40, CD80, CD86, CD83, CD1a and HLA-DR (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), by flow cytometry as explained previously.<sup>23</sup>

### **Proliferation response to ADAMTS13-derived peptide**

Cells from the spleen and draining lymph nodes from immunized Sure-L1 mice were pooled. Cells ( $10^5$  cells/well) were incubated alone, with each individual synthetic ADAMTS13-derived peptide ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) or with a pool containing all the peptides ( $2.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of each peptide) in AIMV medium (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 4 days. Cell proliferation was determined by incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine ( $1 \mu\text{Ci}$  per well, specific activity of  $6.7 \text{ Ci.mmol}^{-1}$ ) added during the final 16 hr and measured as counts per minute (cpm) on a micro- $\beta$ -counter (Perkin Elmer Applied Biosystems). Stimulation indexes (SI) were calculated as the ratio between the cpm in the presence of a stimulus, and the average cpm of the same cells incubated alone.

### **Generation of mouse ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas**

Cells from draining lymph nodes of immunized Sure-L1 mice were stimulated 72 hr with rhADAMTS13 ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and fused with the BWZ.36 fusion (TCR<sup>-/-</sup>) partner cell line<sup>24</sup> (a kind gift from Prof N Shastri, University of California, Berkeley, CA, USA) using polyethylene glycol. ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas were

obtained after culture in HAT and HT selective media (both from Sigma). Specificity for ADAMTS13 was evaluated using a T-cell stimulation assay.

### **T-cell hybridoma stimulation assay**

Mouse HLA-DR1-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas (10<sup>5</sup> cells/well) were cultured in 96 round bottom plates with 10<sup>4</sup> (ratio 1:10) DRB1\*01:01 APC (splenocytes or immature Mo-DCs) in the presence of rhADAMTS13 (10 µg.mL<sup>-1</sup>) for 24 hr at 37°C. Murine interleukin 2 (IL-2) secreted by activated T-cells was measured in the supernatant by an ELISA Kit (eBioscience, Paris, France) according to manufacturer protocol. Positive control used was concanavalin A (Sigma) at 1 µg.mL<sup>-1</sup>. For each hybridoma cell line growing in HAT media, stimulation index (SI) was calculated. Hybridoma clones with an at least two-fold increase in IL-2 release (ratio between ADAMTS13 stimulated cultures and control medium) were considered to be ADAMTS13-specific and were subsequently sub-cloned by limiting dilution (0.5 cell/well). Among ADAMTS13-specific T-cell hybridomas, screening for peptide specificity was realized with AAPC<sup>DR1</sup> co-cultured for 24 hours with peptides at 10 µg.mL<sup>-1</sup>, and IL-2 secretion by activated T-cells hybridoma was measured in the supernatant with the same ELISA Kit.

### **Generation of ADAMTS13-specific human CD4<sup>+</sup> T-cell lines**

Using the accelerated co-cultured DC (acDC) assay,<sup>25</sup> PBMCs from a TTP patient were stimulated for 10 days with the pool of 16 ADAMTS13-derived peptides, (2.5 µg.mL<sup>-1</sup> for each peptide). Briefly, cells (5.10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup>) were thawed and cultured in AIM-V medium culture supplemented with 1000 U.mL<sup>-1</sup> of GM-CSF, 500 U.mL<sup>-1</sup> of IL-4 (ImmunoTools). After 24 hr (day 1), the pool of ADAMTS13-

derived peptides was added along with TNF- $\alpha$  (1000 U.mL<sup>-1</sup>), IL-1 $\beta$  (10 ng.mL<sup>-1</sup>), IL-7 (0.5 ng.mL<sup>-1</sup>) (ImmunoTools) and prostaglandin E2 (1 $\mu$ M; Merck Calbiochem, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). On day 10, non-adherent cells were collected, washed, and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were isolated by negative magnetic purification with a CD4<sup>+</sup> T-cell isolation kit (Miltenyi). Cells were then incubated with irradiated DRB1\*01 Mo-DCs (45 Gy) from healthy donors (ratio 1:10), pulsed with the pool of ADAMTS13-derived peptides, in fresh AIM-V at 37°C for 6 hours. Subsequently, CD4<sup>+</sup> T-cells reactive to ADAMTS13-derived peptides were isolated using the IFN- $\gamma$  secretion assay-cell detection kit (Miltenyi) according to manufacturer protocol. Cell lines were obtained after culture of the IFN- $\gamma$ -secreting cells in AIM-V medium supplemented with 10% human AB serum, IL-2 (20 U.mL<sup>-1</sup>), IL-4 (5 ng.mL<sup>-1</sup>), anti-CD3 mAb (OKT3, 30 ng.mL<sup>-1</sup>) (ImmunoTools) and irradiated (45Gy) PBMC from 2 unrelated donors. Cells were fed every 7 days with fresh cytokines. The stimulated CD4<sup>+</sup> T cells were tested after ~3 weeks for peptide specificity by IFN- $\gamma$  ELISPOT after incubation with peptide-pulsed or non-pulsed APC.

### **ELISPOT assays**

The human IFN- $\gamma$  ELISPOT was performed according to the manufacturer's recommendations. Ninety-six-well polyvinylidene fluoride plates (Millipore-Merck) were pre-wetted with ethanol. The individual ADAMTS13-derived peptides (10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), the peptide pool, or medium alone were plated in triplicate wells, into the plates that had been pre-coated overnight with the anti-IFN- $\gamma$  capture antibody (U-CyTech, Utrecht, the Netherlands) and blocked with AIMV plus 10% human serum. Irradiated AAPC<sup>DR1</sup> (45 Gy) were then seeded and incubated (3x10<sup>4</sup>/well) with the CD4<sup>+</sup> T-cell line (3x10<sup>5</sup>/well) for 24 hr at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator. Following PBMC removal, IFN-

γ secretion was visualized with a biotin-conjugated anti-IFN-γ antibody (U-CyTech), alkaline phosphatase-conjugated ExtrAvidin, and Sigmafast 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) tablets (Sigma). Plates were then air dried and scanned on an ImmunoSpot Analyzer (CTL, Shaker Heights, Ohio). Spot-forming cells (SFCs) were automatically calculated by the ImmunoSpot Software using the SmartCount™ and Autogate™ functions <sup>26</sup>. ELISPOT readouts are expressed as SFCs/10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T-cells. Peptides that generated at least twice the SFCs over the control wells were defined as eliciting a positive response.

## RESULTS

### **Few ADAMTS13-derived peptides are high binders to HLA-DRB1\*01:01 molecules**

We hypothesized that the T-cell epitopes of rhADAMTS13 correspond to ADAMTS13-derived peptides that are stably binding to the groove of class II MHC molecules. The candidate peptides should thus bind with a high affinity to HLA-DR molecules. Using the IEDB consensus method prediction tool for MHC class II binding, we first predicted the array of ADAMTS13-derived 15-mer peptides that bind to the HLA-DRB1\*01:01 (DR1) allele. Altogether, fifteen 15-mer peptides with unique core sequences were predicted to be strong binders to HLA-DR1 with binding scores below 10 (Table 1). The corresponding synthetic 15 peptides were used in binding assays to determine *in vitro* affinities for purified HLA-DRB1\*01:01 molecules by competition ELISA. The calculated IC<sub>50</sub> values ranged from 0 to 5000 nM (Table 1). Five peptides bound to DR1 with an IC<sub>50</sub> below 4 nM, an affinity greater than that of the influenza HA<sup>306-318</sup> control peptide (IC<sub>50</sub> = 4.61 nM). Three peptides revealed a

poor binding capacity with IC<sub>50</sub> 20-fold greater than that of the HA control peptide, despite a good IEDB-predicted binding score.

### **ADAMTS13-derived peptides activate ADAMTS13-specific mouse CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas restricted to HLA-DRB1\*01:01**

To assess whether the ADAMTS13-derived HLA-DR1 binding peptides are T-cell epitopes and are presented to T-cells by antigen-presenting cells, we generated ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas restricted to the HLA-DR1 allele. Induction of an anti-rhADAMTS13 immune response in a humanized transgenic HLA-DR1 mouse was confirmed by ELISA (Figure 1A). Cells from the draining lymph nodes were fused to a TCR<sup>-/-</sup> partner (BWZ36) and 95 CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas were selected. Among them, 26 hybridomas produced IL-2 following incubation with splenocytes from Sure-L1 mice in the presence of rhADAMTS13. The 26 hybridomas were subsequently sub-cloned.

We next evaluated the activation of the T-cell hybridomas by the 15-mer peptides. The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide was the only peptide to induce a significant secretion of IL-2 in all the hybridoma cell lines tested (tested for 6 of the 26 rhADAMTS13-reactive T-cell hybridomas; representative result shown for one T cell-hybridoma in Figure 1B). To delineate more precisely the T-cell epitope recognized by the T-cell hybridomas, overlapping 15-mer peptides that span aa 1235 to 1256 were synthesized and were assessed for their capacity to activate one of the T-cell hybridomas (Clone 2G10δ). Significant T-cell activation was observed for peptides 1237-1251, 1238-1252, 1239-1253, 1240-1254 and 1241-1255 (Figure 1C). Conversely, peptides 1235-1249, 1236-1250 and 1242-1256 failed to activate the T-cell hybridoma. Similar results were obtained with another T-cell hybridoma (clone

1F5y, data not shown). These results demonstrate that the minimal core peptide sequence recognized by the ADAMTS13-specific DRB1\*01:01-restricted T-cell hybridomas is <sup>1241</sup>MLLLWGRLTWR<sup>1251</sup>. Anchor residues for binding of peptide 1239-1353 to the HLA groove are highlighted in Table 1: L1, W4, R6 and W9.

### **The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is recognized by CD4<sup>+</sup> T-cells from humanized Sure-L1 HLA-DRB1\*01:01 mice**

Next, we asked whether other peptides than the one identified using the hybridoma technology may be recognized by polyclonal CD4<sup>+</sup> T-cells from Sure-L1 mice immunized with rhADAMTS13. Splenocytes and cells from the draining lymph nodes from two immunized Sure-L1 mice were stimulated with the individual ADAMTS13-derived peptides previously identified to bind to HLA-DRB1\*01:01 with a high affinity. A significant cell proliferation was observed in the case of ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide (Figure 2A), confirming that this peptide is a dominant CD4<sup>+</sup> T-cell epitope, at least in mice.

### **The ADAMTS13 T-cell epitope identified in humanized Sure-L1 HLA-DRB1\*01:01 mice is presented by human antigen-presenting cells**

We then investigated whether the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is generated by professional human antigen-presenting cells and presented to CD4<sup>+</sup> T-cells in a HLA-DRB1\*01:01 context. To this end, immature HLA-DRB1\*01:01 Mo-DCs were incubated with rhADAMTS13 and with T-cell hybridomas of known specificity for the 1239-1253 peptide. T cells incubated with Mo-DCs in the presence of the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide presented with a stimulation index of 22.2±1.9 (Figure 2B). In contrast, incubation of the cells with the ADAMTS13<sup>111-125</sup> control peptide did

not result in T-cell activation (stimulation index:  $1.1 \pm 0.0$ ). Interestingly, incubation of T cells and Mo-DCs with rhADAMTS13 induced T-cell activation with a stimulation index of  $3.3 \pm 0.6$ , indicating that rhADAMTS13 is efficiently processed by human antigen-presenting cells, and that the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is readily generated.

**The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is a dominant T-cell epitope in a TTP patient with the HLA-DRB1\*01:01 allele**

We then assessed whether the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is recognized by CD4<sup>+</sup> T-cells from patients with acquired TTP. CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes were isolated from the blood of a 43 years-old HLA-DRB1\*01:01 male, 14 days after the onset of acute acquired TTP. In the patient, the ADAMTS13 activity was less than 5% of normal value due to the presence of inhibitory antibodies directed to ADAMTS13. A CD4<sup>+</sup> T-cell line specific for ADAMTS13-derived peptides was amplified from the patient's PBMCs as explained. After 32 days of culture, the CD4<sup>+</sup> T-cell line produced IFN- $\gamma$ , as assessed by ELISPOT, following incubation with Mo-DCs of HLA-DR1 healthy donors, pulsed with the pool of ADAMTS13-derived peptides with high binding affinity for HLA-DR1, but failed to produce IFN- $\gamma$  when incubated with Mo-DCs alone (data not shown). We then incubated the T-cell lines with AAPC<sup>DR1</sup> and with each individual peptide. Together with the ADAMTS13<sup>1392-1406</sup> peptide, the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> was the only peptide able to activate human IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T-cells (Figure 2C). Similar results were obtained when the T-cells and ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide were incubated in the presence of HLA-DR1 Mo-DCs (data not shown). Further evaluation of the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide by IEDB predicted good binding scores to HLA-DR11, 15, 13, 8, 3 and 4, which was confirmed in competitive ELISA at least in the

case of HLA-DR11 and DR15 (Table 2). T-cell lines were also generated from one TTP female patient in acute phase (aged 19, Figure 3A), one TTP female patient in remission phase (aged 34, Figure 3B) and one 25-year old male healthy donor (Figure 3C), all with the HLA-DRB1\*11:01 allele. Reactivity towards the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide was detected in the case of the three individuals. Together, our data suggest that the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is a dominant and promiscuous T-cell epitope in TTP patients.

## DISCUSSION

In the present study, we delineated the ADAMTS13-derived peptides that are potent T-cell epitopes in the context of the HLA-DR1 haplotype. An array of ADAMTS13-derived peptides that are processed and presented by Mo-DCs had been previously reported in the case of healthy donors with different HLA-DR haplotypes.<sup>13</sup> As many as 11 core peptides had thus been retrieved from the HLA-DR-binding groove; the peptides spanned 6 different domains of ADAMTS13. In order to identify HLA-DR-restricted T-cell epitopes of ADAMTS13, we took advantage of the humanized Sure-L1 mouse strain. Sure-L1 mice are invalidated for murine MHC class I and II molecules and transgenic for HLA-DRB1\*01:01. HLA transgenic mice have been proven an appropriate human counterpart for the characterization of T-cell epitopes derived from pathogens<sup>21</sup> as well as therapeutic proteins.<sup>27</sup> In agreement with this, our results demonstrate that the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide identified as an immunodominant T-cell epitope using *in silico* prediction, *in vitro* binding assays and T-cell hybridoma generation, is processed by human Mo-DCs *in vitro* and activates

CD4<sup>+</sup> T cells both *in vivo* in Sure-L1 mice, and *ex vivo* in the case of cells from patients with TTP.

The *in silico* selection of the ADAMTS13-derived peptides was based on the hypothesis that the T-cell epitope of rhADAMTS13 binds with a high affinity to HLA-DR molecules. The prediction efficiency of IEDB for HLA class II-binding peptides has been validated for various antigens, including human plasma protein, and correlates adequately with HLA binding, as measured by competitive ELISA.<sup>15–17</sup> For instance, T-cell epitopes of the human pro-coagulant factor VIII were identified using the hybridoma technology in an HLA-DR15 transgenic mouse model upon screening a peptide library spanning the entire sequence of the protein.<sup>27</sup> Our unpublished data demonstrate a strong correlation between the predicted IEDB binding score for HLA-DR15 and the CD4<sup>+</sup> T-cell epitope found in this work through hybridoma technology (area under the ROC curve=0.90). *In silico* prediction may nevertheless be over-predictive and positively select peptides that do not activate T cells.<sup>28</sup>

In the case of ADAMTS13, HLA-DR11 has been identified as a major risk factor for TTP. Sorvillo *et al.* identified 11 hypothetical T-cell epitopes following purification from HLA-DR molecules expressed by ADAMTS13-loaded Mo-DCs of healthy donors with several HLA haplotype.<sup>13</sup> The ADAMTS13-derived core sequence <sup>1328</sup>FINVAPHAR<sup>1336</sup> was shown to be preferentially presented by HLA-DR11 molecule,<sup>13</sup> and stimulated CD4<sup>+</sup> T cells from at least one TTP patient.<sup>14</sup> In our hands, the ADAMTS13<sup>1325-1339</sup> peptide, that contains the same core sequence, was predicted as a high binder HLA-DR1 peptide. It however failed to bind HLA-DRB1\*01:01 and to activate human CD4<sup>+</sup> T cells from a DRB1\*01:01 patient. Besides, the ADAMTS13<sup>1325-1339</sup> peptide did not activate CD4<sup>+</sup> T cells from 2 TTP patients with the HLA-DRB11 allele. Whether this results from differences in peptide

length and in the nature of the residues adjacent to the core peptide, remains to be determined.<sup>29,30</sup>

Our rationale for focusing our study on the HLA-DRB1\*01:01 allele is justified by the availability of an appropriate transgenic HLA-DRB1\*01:01 mouse model, and by the fact that the HLA-DRB1\*01:01 allele is found in 18% of the patients with acquired TTP<sup>10</sup> and in 15 to 30% of the Caucasian population.<sup>31</sup> Interestingly, 11 of the 15 peptides predicted to bind HLA-DR1 by IEDB were also predicted to have a high affinity for the HLA-DRB1\*11:01 allele. In particular, the unique immunodominant HLA-DRB1\*01:01-associated T-cell epitope characterized in our work, ADAMTS13<sup>1239-1253</sup>, demonstrated an excellent binding score to HLA-DRB1\*11:01 (score of 1.2) and HLA-DRB1\*15:01, strong affinity for HLA-DRB1\*11:01 and HLA-DRB1\*15:01 in competitive ELISA (Table 2), and was a target epitope of CD4<sup>+</sup> T cells from 2 TTP patients and 1 healthy donor with the HLA-DRB11 allele. Of note, the ADAMTS13<sup>1240-1252</sup> peptide, that shares the identical core peptide with the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide, was identified by the study of Sorvillo *et al.* in the case of Mo-DCs from a patient with the HLA-DR4/DR13 haplotype.<sup>13</sup> Together with our IEDB prediction, the data suggest that the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide exhibits promiscuity for at least three HLA-DR alleles: DR1, DR11 and DR15. Additional work including more HLA-DR alleles is required to determine whether pathogenic recognition of ADAMTS13 by CD4<sup>+</sup> T cells is principally directed to promiscuous immunodominant epitopes such as the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide, or whether private T-cell epitopes dominate in the case of HLA-DR alleles that are predominantly associated with acquired TTP.

We cannot exclude the existence of additional immuno-dominant T-cell epitopes potentially overlooked in our experimental approach. Besides, additional work is

required to link our findings to the Th2 polarization of CD4<sup>+</sup> T cell and production of anti-ADAMTS13 autoantibodies. Yet, identification of the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide as a promiscuous immuno-dominant T-cell epitope may have clinical implications at term. It shall pave the way towards the characterization of the ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response in TTP patients using ADAMTS13<sup>1239-1253</sup>-loaded HLA-DR tetramers. Such a tool would provide new insights on the mechanisms implicated in the breakdown of tolerance to ADAMTS13 and should be of clinical relevance to follow in a quantitative manner populations of ADAMTS13-specific T cells in the course of TTP treatment and anticipate relapse. In particular, confirmation of our results would lead to identification of prognostic factors (persistence of specific Th17 T cells, generation of regulatory T cells) that would help in the decision process for the pre-emptive use of Rituximab to prevent relapse.<sup>32</sup>

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Professor John Robinson (Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) for his advice in generating the ADAMTS13-specific T-cell hybridomas. This study 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 the 2012 Prof. Heimbürger Award from CSL-Behring (Marburg, Germany). LG was the recipient of a « Poste d'accueil INSERM » fellowship and Bourse Marcel Simon - Société Française de Médecine Interne (SNFMI).

## **AUTHOR CONTRIBUTION**

LG, PC, SK and SLD designed the research and wrote the paper. LG, SD, IP, MI, YL, BG, BM, YK, MS, AP, JBL, MH, OT, PL performed the research. PC and LGa provided patients' samples. AV performed the ADAMTS13 investigation for medical diagnosis in human samples and reviewed the manuscript. LG, BM, PC and SLD analysed the data.

## **REFERENCES**

1. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1998 ;339(22):1585–1594.
2. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, et al. Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1998;91(8):2839–2846.
3. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature.* 2001 ;413(6855):488–494.
4. Coppo P, Bengoufa D, Veyradier A, et al. Severe ADAMTS13 deficiency in adult idiopathic thrombotic microangiopathies defines a subset of patients characterized by various autoimmune manifestations, lower platelet count, and mild renal involvement. *Medicine (Baltimore).* 2004;83(4):233–244.
5. Zheng XL, Wu HM, Shang D, et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2010;95(9):1555–1562.

6. Ferrari S, Palavra K, Gruber B, et al. Persistence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2014;99(4):779–787.
7. Thomas MR, de Groot R, Scully MA, et al. Pathogenicity of Anti-ADAMTS13 Autoantibodies in Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *EBioMedicine* 2015;2(8):942-952.
8. Pos W, Crawley JTB, Fijnheer R, et al. An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood*. 2010;115(8):1640–1649.
9. Pos W, Luken BM, Sorvillo N, et al. Humoral immune response to ADAMTS13 in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2011;9(7):1285–1291.
10. Coppo P, Busson M, Veyradier A, et al. HLA-DRB1\*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J Thromb Haemost JTH*. 2010;8(4):856–859.
11. Scully M, Brown J, Patel R, et al. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J Thromb Haemost JTH*. 2010;8(2):257–262.
12. John M-L, Hitzler W, Scharrer I. The role of human leukocyte antigens as predisposing and/or protective factors in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*. 2012;91(4):507–510.
13. Sorvillo N, van Haren SD, Kaijen PH, et al. Preferential HLA-DRB1\*11-dependent presentation of CUB2-derived peptides by ADAMTS13-pulsed dendritic cells. *Blood*. 2013;121(17):3502–3510.

14. Verbij FC, Turksma AW, de Heij F, et al. CD4<sup>+</sup> T cells from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura recognize CUB2 domain-derived peptides. *Blood*. 2016;127(12):1606–1609.
15. Wang P, Sidney J, Dow C, et al. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol*. 2008;4(4):e1000048.
16. Wang P, Sidney J, Kim Y, et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:568.
17. Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, et al. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D405–412.
18. Plaimauer B, Kremer Hovinga JA, Juno C, et al. Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies. *J Thromb Haemost JTH*. 2011;9(5):936–944.
19. Texier C, Pouvelle-Moratille S, Busson M, et al. Complementarity and redundancy of the binding specificity of HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 molecules. *Eur J Immunol*. 2001;31(6):1837–1846.
20. Texier C, Pouvelle S, Busson M, et al. HLA-DR Restricted Peptide Candidates for Bee Venom Immunotherapy. *J Immunol*. 2000;164(6):3177–3184.
21. Pajot A, Michel M-L, Fazilleau N, et al. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol*. 2004;34(11):3060–3069.
22. Garnier A, Hamieh M, Drouet A, et al. Artificial antigen-presenting cells expressing HLA class II molecules as an effective tool for amplifying human specific memory CD4(+) T cells. *Immunol Cell Biol*. 2016;94(7):662–672.

23. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, et al. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood*. 2003;101(2):758–765.
24. Sanderson S, Shastri N. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int Immunol*. 1994;6(3):369–376.
25. Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault M-C, et al. acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses. *Blood*. 2011;118(8):2128–2137.
26. Lehmann PV. Image analysis and data management of ELISPOT assay results. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2005;302:117–132.
27. Steinitz KN, van Helden PM, Binder B, et al. CD4+ T-cell epitopes associated with antibody responses after intravenously and subcutaneously applied human FVIII in humanized hemophilic E17 HLA-DRB1\*1501 mice. *Blood*. 2012;119(17):4073–4082.
28. Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. Predictions versus high-throughput experiments in T-cell epitope discovery: competition or synergy? *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(1):43–54.
29. Carson RT, Vignali KM, Woodland DL, et al. T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity*. 1997;7(3):387–399.
30. Holland CJ, Cole DK, Godkin A. Re-Directing CD4(+) T Cell Responses with the Flanking Residues of MHC Class II-Bound Peptides: The Core is Not Enough. *Front Immunol*. 2013;4:172.
31. González-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse

drug reaction associations. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D784–788.

32. Hie M, Gay J, Galicier L, et al. Preemptive rituximab infusions after remission efficiently prevent relapses in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2014;124(2):204–210.

## TABLES

**Table 1. Affinity of ADAMTS13-derived peptides for HLA-DRB1\*01:01 molecules**

|     | ADAMTS13 peptide | Domain          | Sequence <sup>#</sup>                                        | IC <sub>50</sub> (nM) <sup>†</sup> | Predicted binding score <sup>‡</sup> |
|-----|------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1   | 589-603          | Spacer          | RPL <b>F</b> TH <b>L</b> AVRIGGRY                            | 0.46                               | 7.01                                 |
| 2   | 267-281          | Metalloprotease | RRQ <b>L</b> LS <b>L</b> SAG <b>R</b> ARC                    | 0.91                               | 1.36                                 |
| 3   | 371-385          | Desintegrin     | CRS <b>L</b> VEL <b>T</b> P <b>I</b> A <b>A</b> VHG          | 1.59                               | 4.22                                 |
| 4   | 1239-1253        | CUB1            | GDM <b>L</b> LL <b>W</b> G <b>R</b> LT <b>W</b> RKM          | 1.61                               | 7.08                                 |
| 5   | 1392-1406        | CUB2            | EGF <b>L</b> KA <b>Q</b> AS <b>L</b> R <b>G</b> QYW          | 3.74                               | 1.62                                 |
| 6   | 1355-1369        | CUB2            | ASY <b>I</b> LI <b>R</b> DT <b>H</b> SL <b>R</b> TT          | 5.65                               | 6.65                                 |
| 7   | 774-788          | TSR 3           | GSL <b>L</b> K <b>T</b> L <b>P</b> PAR <b>C</b> RAG          | 7.11                               | 5.65                                 |
| 8   | 570-584          | Spacer          | YVT <b>F</b> LT <b>V</b> T <b>P</b> N <b>L</b> TSVY          | 13.10                              | 0.79                                 |
| 9   | 914-928          | TSR 5           | ELR <b>F</b> LC <b>M</b> DSAL <b>R</b> VPV                   | 12.6                               | 3.24                                 |
| 10  | 1224-1238        | CUB1            | VVT <b>L</b> RV <b>L</b> ESS <b>L</b> NCSA                   | 13.68                              | 6.21                                 |
| 11  | 1281-1295        | CUB1            | GVL <b>L</b> RY <b>G</b> S <b>Q</b> LAPETF                   | 28.34                              | 6.90                                 |
| 12  | 464-478          | Cys-Rich        | GAS <b>F</b> Y <b>H</b> W <b>G</b> AA <b>V</b> PH <b>S</b> Q | 31.07                              | 8.42                                 |
| 13  | 1325-1339        | CUB2            | CRL <b>F</b> IN <b>V</b> AP <b>H</b> AR <b>I</b> AI          | 147.97                             | 1.99                                 |
| 14  | 140-154          | Metalloprotease | APN <b>I</b> TAN <b>L</b> TSS <b>L</b> LSV                   | 279.67                             | 9.74                                 |
| 15  | 308-322          | Desintegrin     | NEQ <b>C</b> RV <b>A</b> F <b>G</b> PK <b>A</b> VAC          | 5000                               | 8.11                                 |
| 16* | 111-125          | Metalloprotease | GAEL <b>L</b> LR <b>D</b> PS <b>L</b> GA <b>Q</b> FR         | >10000                             | 20.93                                |

<sup>†</sup>ADAMTS13-derived peptides are sorted based on the measured IC<sub>50</sub> values compared to the HA<sup>306-318</sup> control peptide (IC<sub>50</sub>=4.61 nM). IC<sub>50</sub> values are shown in nM. A lower IC<sub>50</sub> value indicates stronger binding. IC<sub>50</sub>>10000 indicates no detectable binding in the assay.

<sup>‡</sup>Binding scores were generated by IEDB and reflect the expected binding affinities, wherein lower scores indicate stronger predicted affinities.

<sup>#</sup>The 9-residue sequences (core peptides) predicted to fit into the HLA-DRB1\*01:01 binding groove are underlined for each peptide. Anchor residues are highlighted in bold.

\*This ADAMTS13-derived peptide is used as a negative control, without detectable binding to HLA-DRB1\*01:01.

**Table 2. Affinity of ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide for HLA-DRB1 molecules.**

| HLA-DR molecule <sup>#</sup> | Predicted binding score <sup>†</sup> | Relative affinity <sup>‡</sup> |
|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| DRB1*11:01                   | 1.2                                  | 16.04                          |
| DRB1*15:01                   | 1.40                                 | 3.48                           |
| DRB1*13:01                   | 1.72                                 | ND                             |
| DRB1*08:01                   | 4.47                                 | ND                             |
| DRB1*01:01                   | 7.08                                 | 0.27                           |
| DRB1*03:01                   | 7.92                                 | ND                             |
| DRB1*04:01                   | 12.10                                | ND                             |
| DRB1*12:01                   | 25.89                                | ND                             |
| DRB1*07:01                   | 31.19                                | ND                             |
| DRB1*09:01                   | 33.67                                | ND                             |

<sup>#</sup>HLA-DRB1 molecules are classified based on their predicted binding score.

<sup>†</sup>Binding scores were generated by IEDB using the consensus method prediction tool.

<sup>‡</sup>Binding data are estimated as relative affinities defined as the ratio of the IC<sub>50</sub> of the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide to the IC<sub>50</sub> of each reference peptide. Relative affinities of 20 or less were considered high binders to the HLA-DR molecule. The sequences and mean IC<sub>50</sub> values of the reference peptides were the following: HA<sup>306-318</sup> (PKYVKQNTLKLAT) for DR1 (4.61 nM) and DR11 (37.42 nM); A3<sup>152-166</sup> (EAEQLRAYLDGTGVE) for DR15 (41.46 nM).

ND: not done.

## FIGURE LEGENDS

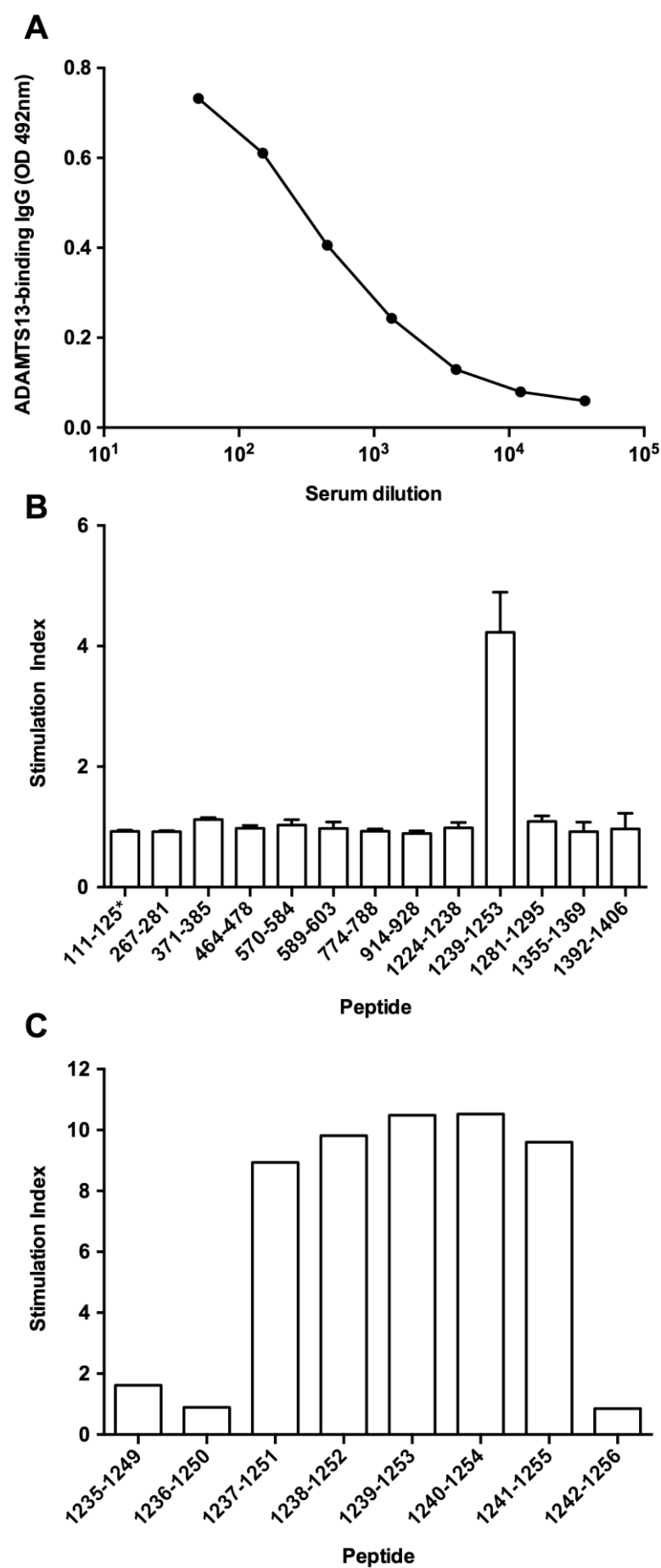
**Figure 1. Identification of HLA-DR1-restricted T-cell epitopes using ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas.** **(A)** Anti-ADAMTS13 IgG titers in Sure-L1 mice immunized with rhADAMTS13. The serum from an HLA-DR1-transgenic Sure-L1 mouse immunized with rhADAMTS13 was incubated in serial dilutions on ADAMTS13-coated ELISA wells. ADAMTS13-bound IgG were detected using horseradish peroxidase-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG and substrate. Results are expressed in arbitrary units as optical density measured at 492 nm. **(B)** Activation of ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas. A representative ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma (clone 2G10δ) was incubated with AAPC<sup>DR1</sup> (10:1 ratio) and ADAMTS13-derived peptides as listed in Table 1. Stimulation indexes represent the ratio of IL-2 secreted by the T-cells measured by ELISA upon incubation with ADAMTS13 peptides over IL-2 secreted in the absence of peptide. Means±SD are from two independent experiments. **(C)** Delineation of the core peptide for ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas. A representative ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma (clone 2G10δ) was incubated with AAPC<sup>DR1</sup> and overlapping 15-mer peptides spanning the 1235-1256 peptide sequence. Stimulation indexes were assessed as explained above.

**Figure 2. The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is an immunodominant T-cell epitope both for Sure-L1 mice as well as for a patient with TTP.** **(A)** Stimulation by ADAMTS13-derived peptides of spleen and lymph node cells from Sure-L1 mice immunized with rhADAMTS13. Cells ( $3 \times 10^5$  /well) were incubated with each individual peptide ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), with the pool of peptides (Peptide mix) or with rhADAMTS13. Proliferation was assessed by incorporation of tritiated thymidine. Proliferation indexes are defined as the ratio of cpm of stimulated cells versus cpm of control cells, and are expressed as means±SD for two Sure-L1 mice. **(B)** The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is processed and presented to T-cells by human APCs. A representative ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma (clone 1F5y) was incubated with immature dendritic cells from a healthy HLA-DR1<sup>+</sup> blood donor and with the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide, with rhADAMTS13 or with the ADAMTS13<sup>111-125</sup> peptide. Stimulation indexes represent the ratio of secretion of IL-2 by T-cells stimulated in the presence of antigen versus the secretion of IL-2 by T-cells incubated with Mo-DCs alone. Means±SD are from two independent experiments. Similar results were obtained with other ADAMTS13-CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma clones (not shown). The peptide incubated alone or with DR15-positive artificial antigen presenting cells failed to activate the T cells (not shown). **(C)** ADAMTS13 epitope specificity of CD4<sup>+</sup> T-cell lines from a patient with acquired TTP. CD4<sup>+</sup> T-cell lines were generated after stimulation with pooled ADAMTS13-derived peptides as defined in Table 1. T-cells ( $3 \times 10^5$  /well) were then incubated with AAPC<sup>DR1</sup> ( $3 \times 10^4$  cells/well) alone or pulsed with individual peptide ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), or with the peptide pool (Peptide mix). The number of

cells producing IFN- $\gamma$  was then assessed by ELISPOT and is expressed as mean number of spot forming cells (SFC) per million cells calculated in the case of peptide-stimulated T-cells minus the SFC obtained in the case of un-stimulated cells. Means $\pm$ SD are from two independent experiments. \*The 111-125 ADAMTS13-derived peptide that did not bind to HLA-DRB1\*01:01 was used as a negative control. \*\*The 1325-1339 ADAMTS13 derived peptide was evaluated despite a low binding for HLA DR1 molecule because it contains the core sequence <sup>1328</sup>FINVAPHAR<sup>1336</sup> that was found located into HLA-DR1 molecule by Sorvillo *et al.*

**Figure 3. The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is an immunodominant T-cell epitope for HLA-DRB1\*11 individuals.** CD4+ T-cell lines from HLA-DRB1\*11 TTP patients at (A) acute phase or (B) in remission phase of the disease, respectively, or from (C) a HLA-DRB1\*11 healthy donor, were stimulated with the ADAMTS13-derived peptides identified as immuno-dominant for HLA-DRB1\*01. T cells ( $3 \cdot 10^5$  cells/well) were incubated with AAPC<sup>DR11</sup> ( $3 \cdot 10^4$  cells/well) alone or pulsed with individual peptide ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), or with the peptide pool (Peptide mix). The number of cells producing IFN- $\gamma$  was then assessed by ELISPOT and is expressed as mean number of spot forming cells (SFC) per million cells calculated in the case of peptide-stimulated T-cells minus the SFC obtained in the case of un-stimulated cells. \*The 111-125 ADAMTS13-derived peptide is used as a negative control, without detectable binding to HLA-DRB1\*11:01 (data not shown).

Figure 1



**Figure 2**

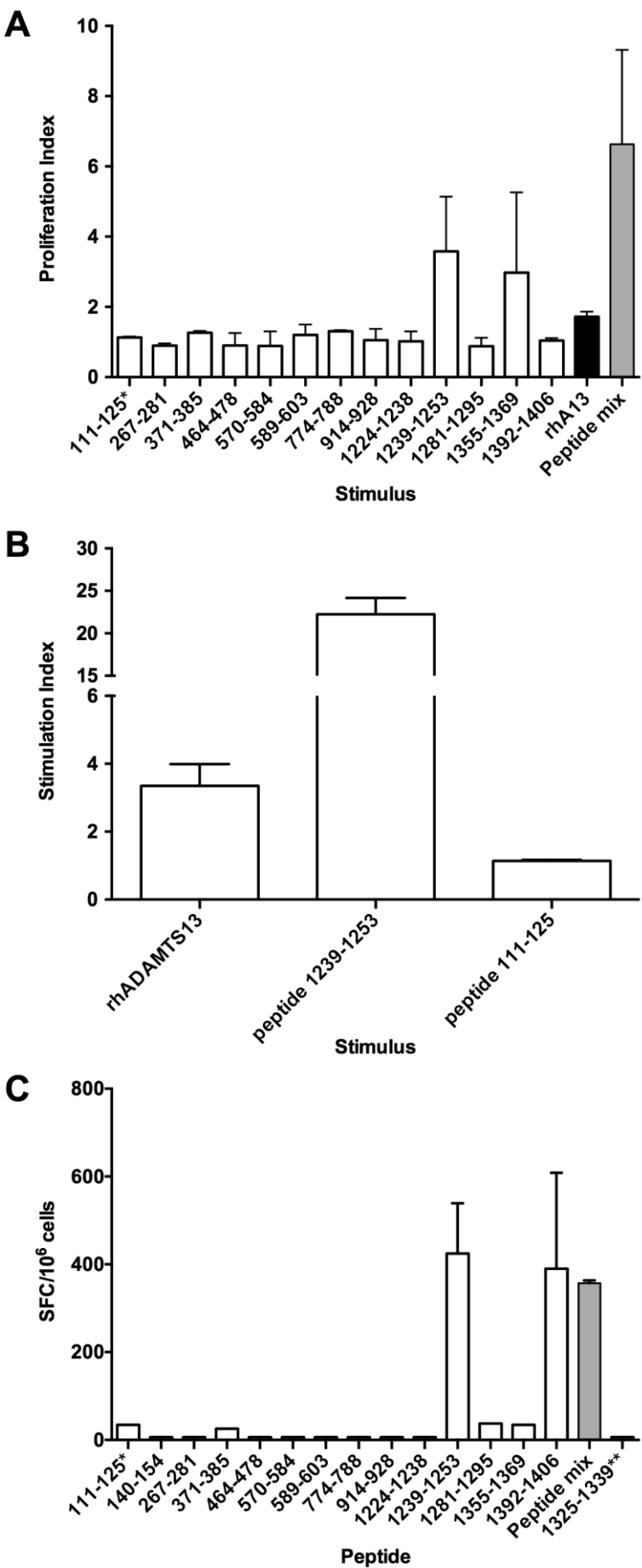
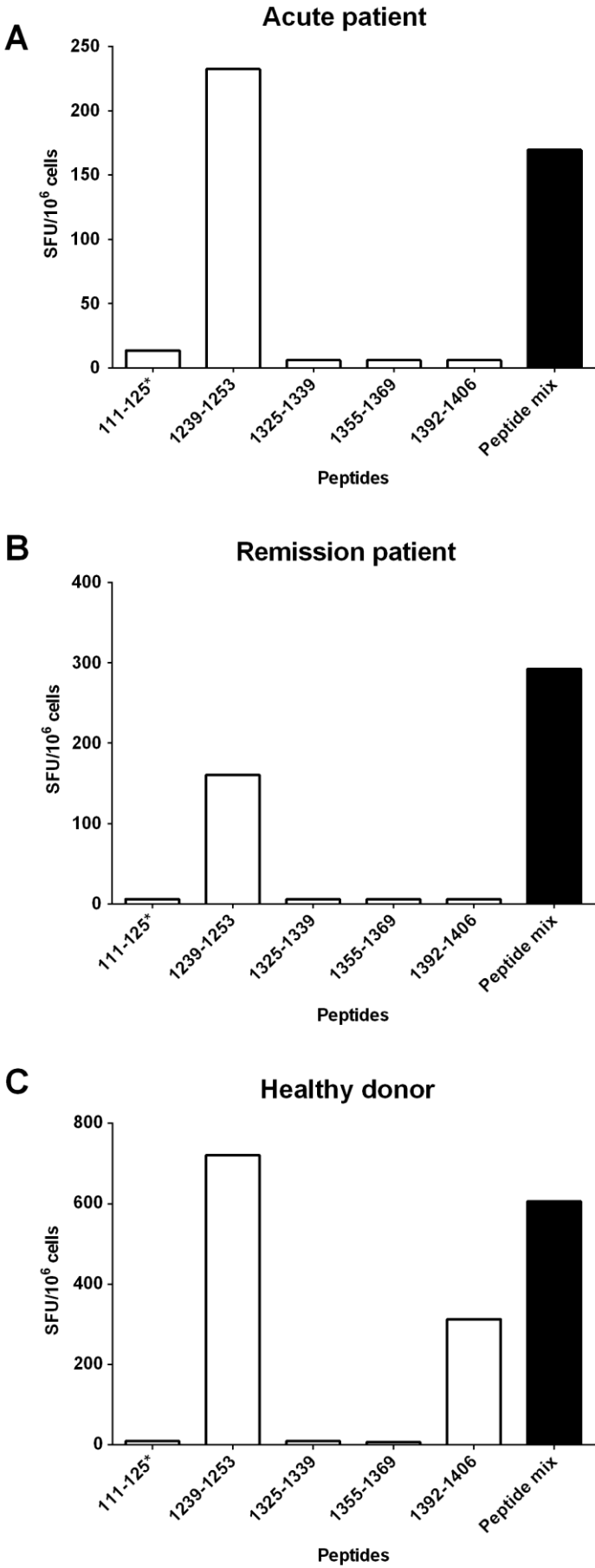


Figure 3



## B. Résultats complémentaires, non publiés

### 1) Analyse IEDB pour l'allèle HLA DRB1\*11:01

Dans un second travail, j'ai entrepris selon la même méthodologie que décrite précédemment (analyse *in silico* et analyse *in vitro* biochimique), l'identification des peptides dérivés d'A13 ayant une forte affinité pour l'allèle HLA DRB1\*11:01. Au total, 341 peptides de 15 acides aminés présentent un score prédictif d'affinité significatif ( $\leq 10$ ) selon l'analyse IEDB avec la méthode « consensus », correspondant à 48 séquences « core » de 9 acides aminés. Les peptides de 15 acides aminés contenant chacun, une de ces séquences « core » flanquée de 3 acides aminés à l'extrémité C-terminale et 3 acides aminés en N terminal, ont été testés par ELISA compétitifs pour leur affinité avec les molécules solubles HLA DRB1\*11:01. Vingt peptides ont montré une affinité significative avec des concentrations allant de 4,2 nM jusqu'à 648,1 nM, dont 6 peptides avec une affinité supérieure au peptide de référence HA<sup>306-318</sup> (PKYVKQNTLKLAT,  $CI_{50} = 37.42$  nM). Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

Vingt-huit peptides possèdent une faible affinité ( $CI_{50}$  20 fois plus grande que celle du peptide de référence), voire une absence de fixation détectable pour les molécules HLA DRB1\*11:01 malgré un bon score prédictif d'affinité selon IEDB.

|     | Peptides<br>d'ADAMTS13 | Domaine         | Séquence <sup>#</sup>                                        | CI <sub>50</sub><br>(nM) <sup>†</sup> | Score<br>prédictif<br>d'affinité <sup>‡</sup> |
|-----|------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 1   | 881-895                | TSR 5           | PSP <b>WGS</b> <u><b>I</b>RTGA<b>Q</b></u> AAH               | 4,2                                   | 6,64                                          |
| 2   | 589-603                | Cys-Rich        | RPL <b>F</b> TH <b>L</b> AVR <b>I</b> GGRY                   | 5,2                                   | 0,78                                          |
| 3   | 600-614                | Cys-Rich        | GGR <b>Y</b> VV <b>AG</b> KMS <b>I</b> SPN                   | 5,7                                   | 0,12                                          |
| 4   | 581-595                | Cys-Rich        | TSV <b>Y</b> IAN <b>H</b> RPL <b>F</b> THL                   | 20,5                                  | 1,06                                          |
| 5   | 1355-1369              | CUB2            | ASY <b>I</b> L <b>I</b> R <b>D</b> TH <b>S</b> LRTT          | 24,5                                  | 3,08                                          |
| 6   | 1242-1256              | CUB1            | LLL <b>W</b> GR <b>L</b> T <b>W</b> R <b>K</b> MCRK          | 31,6                                  | 1,2                                           |
| 7   | 1247-1261              | CUB1            | RLT <b>W</b> R <b>K</b> MCR <b>K</b> L <b>L</b> DMT          | 44,7                                  | 0,08                                          |
| 8   | 121-135                | Metalloprotease | GAQ <b>F</b> RV <b>H</b> L <b>V</b> K <b>M</b> <b>V</b> ILT  | 100,0                                 | 1,32                                          |
| 9   | 683-697                | Spacer          | RQA <b>W</b> V <b>W</b> A <b>A</b> VR <b>G</b> P <b>C</b> SV | 134,2                                 | 2,87                                          |
| 10  | 371-385                | Desintegrin     | CRS <b>L</b> VEL <b>T</b> PIA <b>A</b> VHG                   | 164,3                                 | 1,78                                          |
| 11  | 1325-1339              | CUB2            | CRL <b>F</b> IN <b>V</b> AP <b>H</b> AR <b>I</b> AI          | 200,0                                 | 3,69                                          |
| 12  | 111-125                | Metalloprotease | GAEL <b>L</b> LR <b>D</b> PS <b>L</b> GAQFR                  | 227                                   | 7,04                                          |
| 13  | 172-186                | Metalloprotease | ADL <b>V</b> LY <b>I</b> TR <b>F</b> D <b>L</b> ELP          | 346,4                                 | 3,42                                          |
| 14  | 594-608                | Cys-Rich        | HLA <b>V</b> R <b>I</b> G <b>G</b> RY <b>V</b> VAGK          | 364,7                                 | 4,7                                           |
| 15  | 100-114                | Metalloprotease | TER <b>Y</b> VL <b>T</b> N <b>L</b> N <b>I</b> GAEL          | 424,3                                 | 5,43                                          |
| 16  | 1392-1406              | CUB2            | EGF <b>L</b> KA <b>Q</b> AS <b>L</b> R <b>G</b> QYW          | 500,0                                 | 8,05                                          |
| 17  | 465-479                | TSR 1           | ASF <b>Y</b> HW <b>G</b> AA <b>V</b> PH <b>S</b> QG          | 547,7                                 | 9,89                                          |
| 18  | 264-278                | Desintegrin     | PCS <b>R</b> R <b>Q</b> LL <b>S</b> LL <b>S</b> AGR          | 600,0                                 | 2,15                                          |
| 19  | 1239-1253              | CUB1            | GDM <b>L</b> LL <b>W</b> GR <b>L</b> T <b>W</b> R <b>K</b> M | 600,0                                 | 1,2                                           |
| 20  | 189-203                | Metalloprotease | NRQ <b>V</b> R <b>G</b> VT <b>Q</b> LG <b>G</b> ACS          | 648,1                                 | 5,81                                          |
| 21* | 1277-1291              | CUB1            | RPG <b>G</b> GV <b>L</b> LR <b>Y</b> GS <b>Q</b> LA          | >100000                               | 4,09                                          |

**Tableau 5 :** Peptides dérivés d'ADAMTS13 de forte affinité pour les molécules HLA DRB1\*11:01.

<sup>†</sup>Les peptides dérivés d'A13 sont classés sur la base des CI<sub>50</sub> mesurées et comparées avec le peptide de référence HA<sup>306-318</sup> (PKYVKQNTLKLAT, CI<sub>50</sub>= 37.42 nM). Les CI<sub>50</sub> sont indiquées en nM. Une plus faible valeur d'CI<sub>50</sub> indique une plus forte affinité, le seuil de significativité a été fixé pour une affinité relative (quotient CI<sub>50</sub> du peptide testé sur CI<sub>50</sub> du peptide de référence) inférieure à 20.

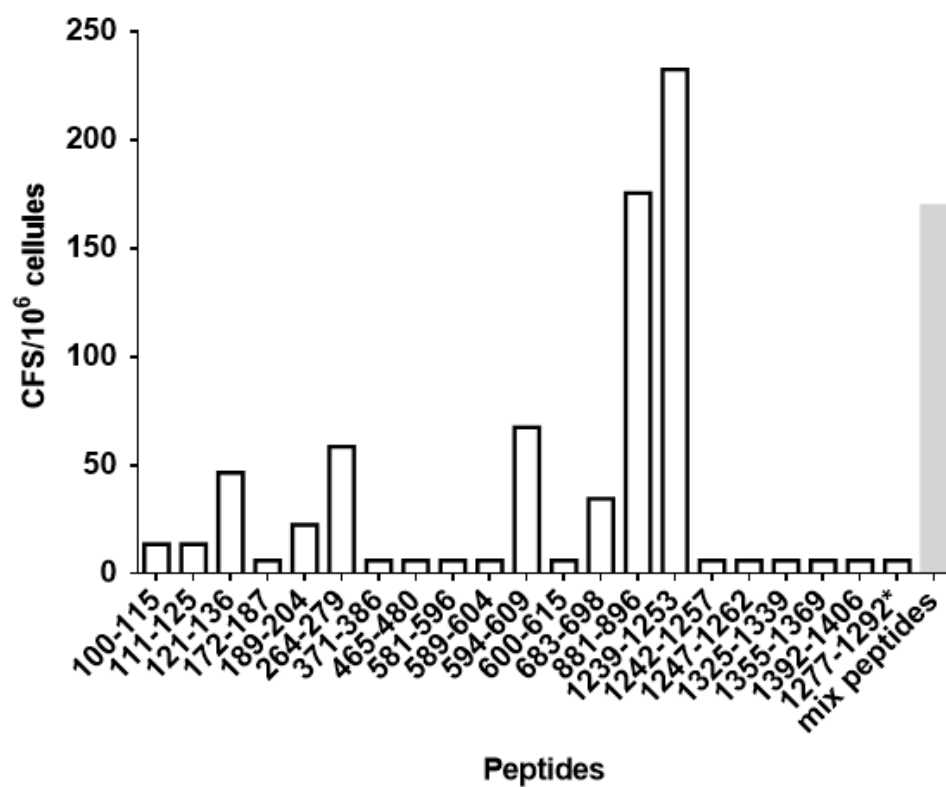
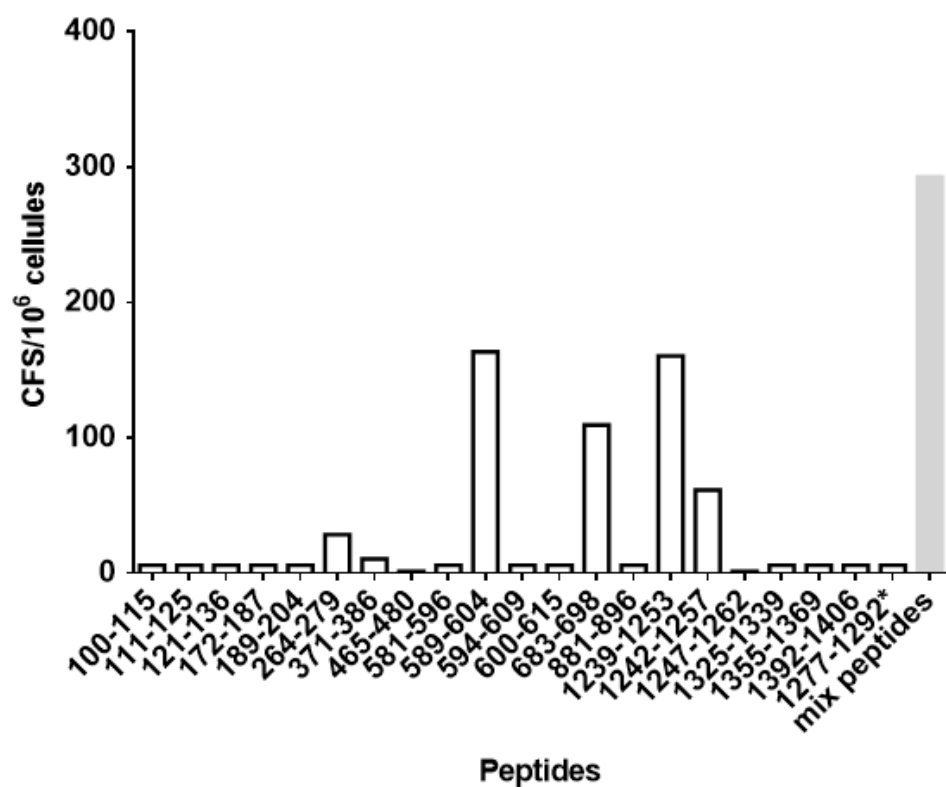
<sup>‡</sup>Les scores prédictifs d'affinité ont été calculés par IEDB, correspondant à la probabilité que le peptide étudié soit de forte affinité avec les molécules HLA DRB1\*11:01. Plus le score est faible, plus la probabilité de fixation sera importante, le seuil de significativité a été fixé pour un score prédictif ≤ 10 (soit une probabilité de fixation ≥ 90%).

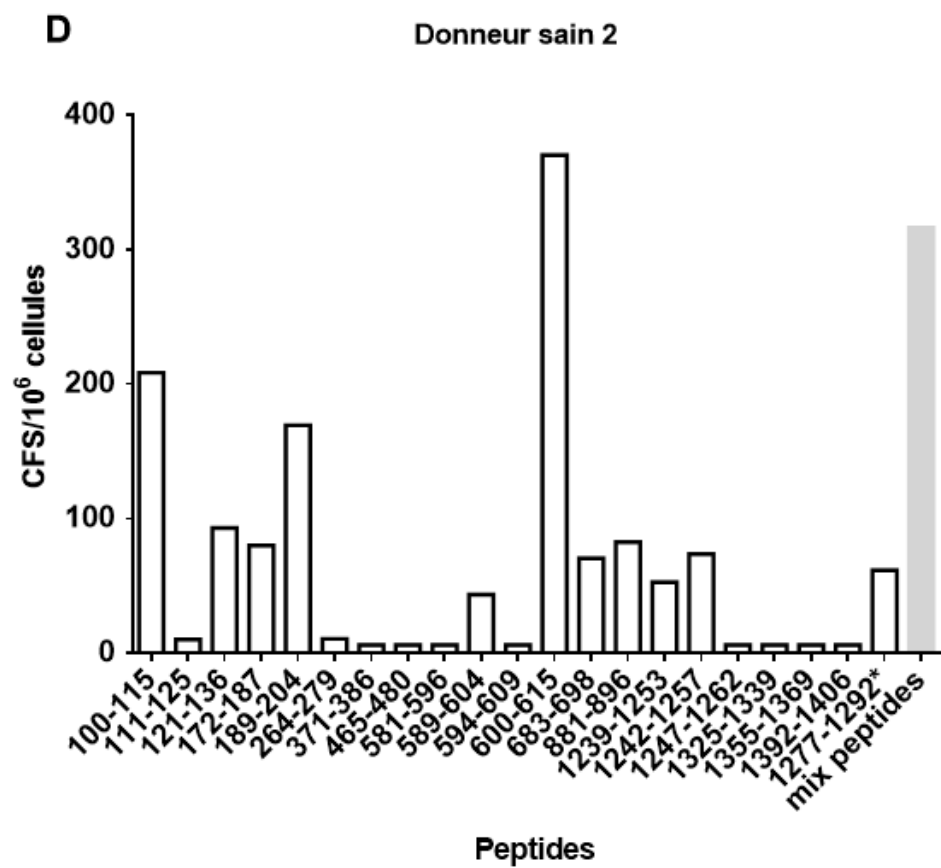
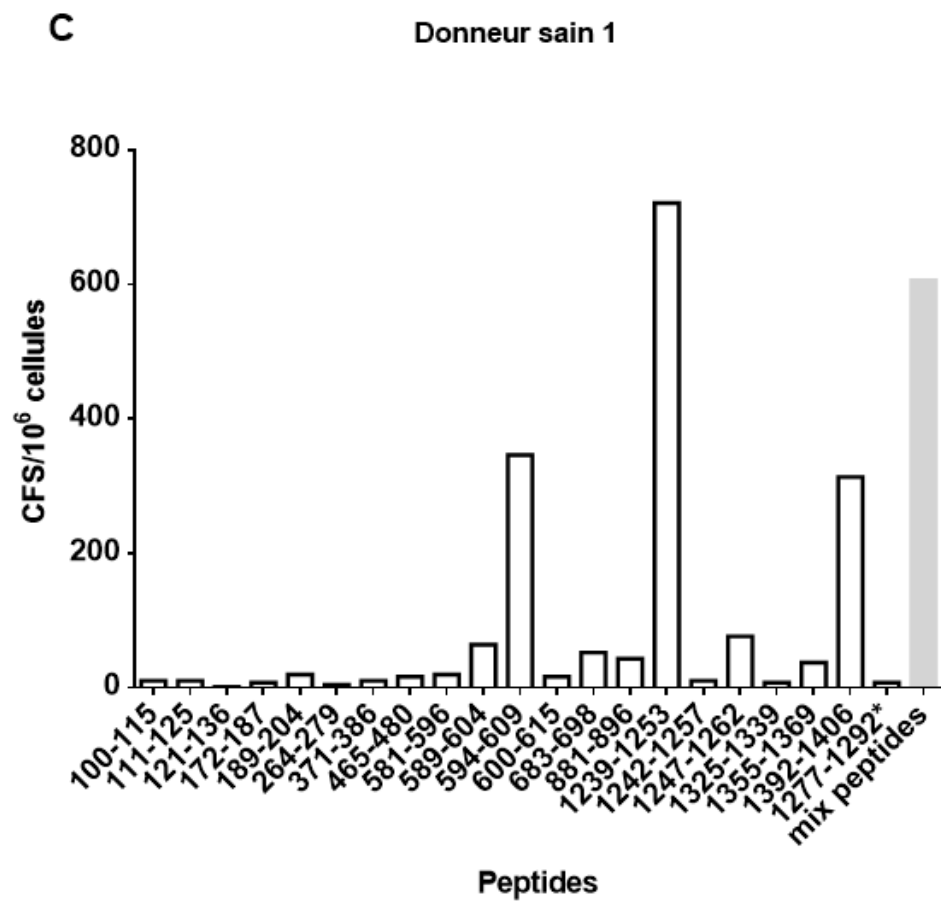
<sup>#</sup>Les séquences « core » de 9 acides aminés correspondant à la partie de peptide localisée au sein de la poche de fixation des molécules HLA sont soulignées pour chaque peptide, les résidus d'ancrage sont indiqués en gras.

\*Ce peptide dérivé d'A13, utilisé comme contrôle négatif pour les expériences de stimulation, a été sélectionné pour son absence de fixation détectable pour les molécules HLA DRB1\*11:01 malgré un score prédictif de fixation élevé.

## 2) Tests de stimulation de lignées lymphocytaires T CD4+ DR11

A partir de cette liste de peptides, selon la même méthodologie que décrite précédemment (cf Figure 3 - article 1), 4 lignées lymphocytaires T CD4+ ont été obtenues après 32 jours de culture (stimulation initiale avec les 19 peptides selon le protocole acDC (accelerated co-cultured Dendritic Cells (218)) puis sélection à J10 des cellules sécrétrices d'Interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) puis 3 semaines d'amplification par stimulation non spécifique). Les cellules mononucléées du sang circulant (PBMCs) utilisées proviennent tous d'individus porteur de l'allèle HLA DRB1\*11 : il s'agit des 2 mêmes patients atteints de PTT acquis que dans l'article 1 (1 à la phase aigüe de la pathologie, l'autre en rémission) et de 2 donneurs sains (1 identique à celui de l'article 1). Toutes les lignées ont sécrété de l'IFN- $\gamma$ , mis en évidence par ELISPOST, après incubation avec le mélange de 21 peptides, présentés par des MoDCs de donneurs sains DR11 (données non montrées). Par la suite, chaque peptide, chargé au sein de cellules présentatrices d'antigène artificielles (CPAA) DR11, a été évalué pour sa capacité à induire une sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lignées lymphocytaires T CD4+. Les résultats sont présentés dans la figure 7. Neuf peptides ont entraîné au moins 1 fois une sécrétion significative d'IFN- $\gamma$ , supérieure à 100 cellules formant des spots/ $10^6$  cellules. Les lignées ont répondu en moyenne à environ 3 peptides, seul le peptide 1239 a induit une sécrétion significative pour plusieurs lignées (n=3).

**A****Patient en phase aigüe****B****Patient en rémission**



**Figure 7 :** Plusieurs peptides dérivés d'A13 sont des épitopes T pour des individus HLA-DRB1\*11.

Des lignées cellulaires de patients HLA DRB1\*11 atteints de PTT acquis à la phase aigüe (A) et en rémission (B) ou de 2 donneurs sains HLA DRB1\*11 (C et D) ont été stimulées avec les peptides dérivés d'A13 identifiés comme ayant une forte affinité pour les molécules HLA-DRB1\*11:01. Les lymphocytes T ( $3.10^5$  cellules/puit) étaient incubés avec des cellules présentatrices d'antigène artificielles DR11 ( $3.10^4$  cellules/puit), seules ou chargées avec chaque peptide ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ou avec l'ensemble des peptides mélangés (concentration finale  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Le nombre de cellules produisant de l'IFN- $\gamma$  était alors évalué par ELISPOT et est exprimé en nombre moyen de cellules formant des spots (CFS) par million de cellules. Pour les lymphocytes stimulés par un peptide, le nombre de CFS retenu est le nombre de CFS observé soustrait par le nombre de CFS observé, chez les lymphocytes non stimulés. Un nombre de CFS est jugé comme significatif lorsqu'il est supérieur à 100 CFS/ $10^6$  cellules.

\*Ce peptide dérivé d'A13 est utilisé comme contrôle négatif pour son absence de fixation détectable pour les molécules HLA DRB1\*11:01.

## IV – DISCUSSION

Les résultats de ce travail ont été obtenus par l'utilisation d'une méthode complexe, originale, qui possède de nombreux atouts mais aussi certaines limites ; ils ont permis d'acquérir des outils permettant de mieux caractériser ADAMTS13 (A13) et d'explorer la physiopathologie du PTT acquis, ouvrant de nombreux champs d'investigations aux multiples applications. Ils soulignent le fait que le PTT est une maladie auto-immune spécifique d'antigène unique mais qui possède de nombreuses homologues avec d'autres pathologies répondant aux mêmes problématiques.

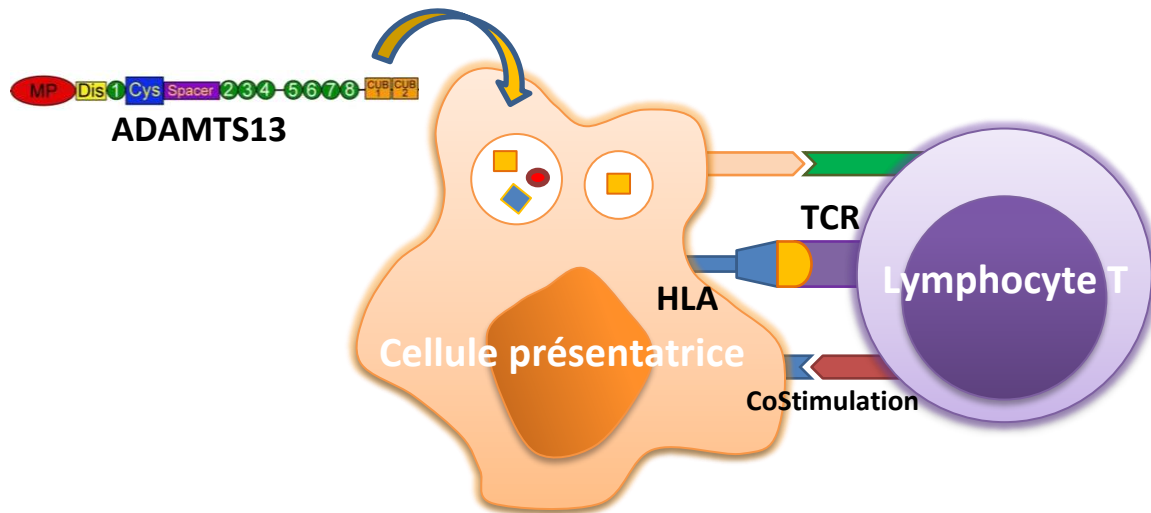
### A. Méthode d'identification des épitopes T

#### 1) Rappels d'immunologie générale

Lors d'une réponse immunitaire chez l'Homme, une protéine endogène ou exogène, dénommée antigène, est initialement phagocytée, souvent après reconnaissance par un récepteur de surface cellulaire. Elle est ensuite apprêtée, avec une digestion par divers processus enzymatiques intracellulaires aboutissant à la formation de peptides d'une taille limitée, qui sont alors couplés à des molécules HLA de classe I ou II. La nature des molécules HLA est déterminée génétiquement pour un individu avec différentes combinaisons d'allèles conférant de la diversité mais il existe une certaine homogénéité concernant la structure et la séquence d'une même molécule (ex : HLA DRB1\*11:01) entre individus.

Les peptides sont alors présentés via ces molécules et reconnus par le récepteur TcR couplé à une molécule CD4 ou CD8 d'un lymphocyte T (Figure 8), entraînant une cascade de signaux

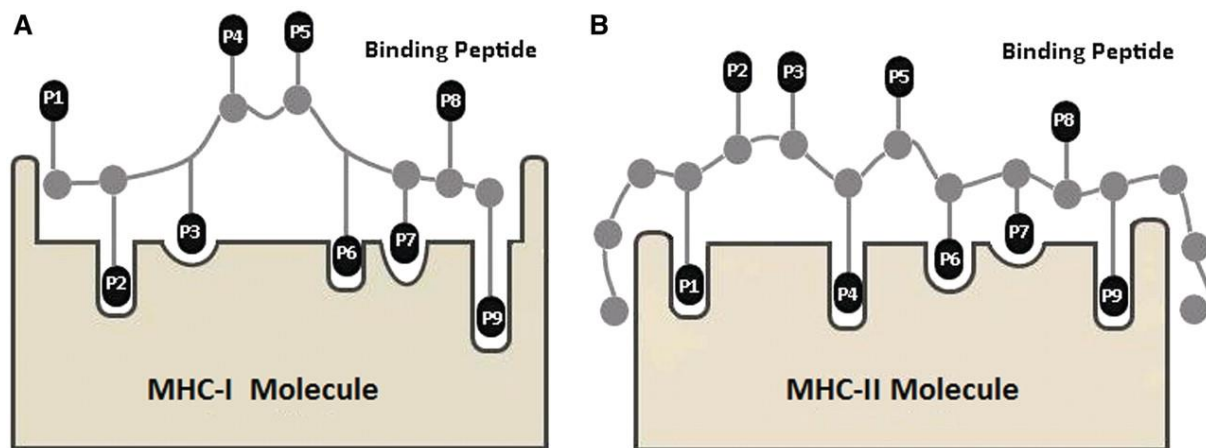
et d'activation cellulaires aboutissant à l'élimination de l'antigène, soit par une réponse cytotoxique et/ou soit par la synthèse d'anticorps spécifiques. L'épitope T correspond à la partie de l'antigène reconnue par le TcR pour un allèle HLA donné, il s'agit donc d'une des premières étapes de la réponse immunitaire dirigée contre l'antigène.



**Figure 8 :** Reconnaissance de l'antigène par le TcR.

Le TcR des lymphocytes T reconnaît un antigène tel que la protéine ADAMTS13, sous la forme de peptide, présenté par les molécules HLA. La captation de l'antigène, sa dégradation et son apprêtement (processing) s'effectue dans les cellules présentatrices d'antigène

Les peptides associés aux molécules HLA de classe I ont une taille limitée, en raison de la poche fermée dans laquelle ils sont localisés, ils mesurent entre 8 et 10 acides aminés (Figure 9A). La poche de fixation des molécules HLA de classe II permet de contenir 9 acides aminés, mais sa configuration ouverte aux extrémités permet de retrouver des peptides mesurant entre 11 et 20 acides aminés (Figure 9B). Dans la cavité formée par les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules HLA de classe II, des liaisons de faible intensité, de type liaisons hydrogène, sont formées avec les acides aminés du peptide antigénique, au niveau de résidus d'« ancrage », localisés en position 1, 4, 6 et 9 du peptide.



**Figure 9 :** Comparaison des poches des sillons des molécules HLA de classe I et de classe II assurant l'encrage des peptides antigéniques présentés aux lymphocytes.

**Partie A :** Dans les molécules HLA de classe I, les extrémités sont fermées et les peptides sont de taille limitée.

**Partie B :** Dans les molécules HLA de classe I, les extrémités sont libres et la taille des peptides peut aller jusqu'à 20 acides aminés. Source : (219)

L'identification des épitopes T d'un antigène est une problématique d'immunologie qui a été abordée dès les années 70 (220). Dans les années 80, les techniques d'identification des épitopes T se sont développées en parallèle des connaissances acquises autour des molécules HLA (221–223). Ainsi, il a été possible au début des années 90, de déterminer la nature des peptides présentés aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> via les molécules HLA de classe I (224) puis rapidement pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> via les molécules HLA de classe II (225).

Plusieurs méthodes d'analyse sont possibles, en fonction de l'antigène étudié et du but des recherches envisagées, mais un des principes communs de ces méthodes consiste à reproduire l'effet immunologique obtenu avec la protéine complète, par un fragment peptidique de cet antigène. Il faut également distinguer parmi les épitopes dominants : ceux qui induisent une réponse chez le maximum d'individus pour un allèle HLA donné, de ceux qui induisent une réponse pour le maximum d'allèles HLA (épitopes partagés ou « promiscuous » (226)). Ces 2 caractéristiques des épitopes sont parfois réunies pour le même peptide, parfois distinctes selon l'antigène et la pathologie considérée. Quelle que soit la méthode d'analyse utilisée,

elles sont basées sur un postulat de départ suggérant que les peptides dérivés de l'antigène doivent posséder une forte affinité avec les molécules HLA. Cette affinité leur permet de demeurer de façon stable dans les poches de fixation et d'être présentés de façon satisfaisante pour être reconnus par les lymphocytes T spécifiques. Dans un précédent travail, nous avons démontré pour des peptides dérivés du Facteur VIII (avec mutations faux-sens responsables d'hémophilie A), que les fortes affinités pour des molécules HLA de classe II, prédites *in silico*, étaient corrélées avec la survenue d'anticorps dirigés contre le Facteur VIII ((227), annexe 3). Ces résultats soutiennent la validité de ce postulat de départ.

## 2) Rappels et précisions concernant l'approche utilisée dans ce travail

Mon approche a comporté 3 étapes :

- La première, *in silico*, a consisté à sélectionner à l'aide du logiciel en ligne « Immune Epitope Database (IEDB) Resource Analysis » disponible sur internet ([www.immuneepitope.org](http://www.immuneepitope.org)), des peptides candidats, susceptibles d'être présentés par les molécules HLA DRB1 (DRB1\*1:01 et DRB1\*11:01) (228). Pour cela, la séquence d'ADAMTS 13 humaine (en excluant *a posteriori* le peptide signal et le propeptide) est découpée en peptides chevauchants (séparés d'un acide aminé) d'une longueur de 15 acides aminés. Il est alors calculé pour chacun, un score prédictif correspondant à la probabilité de se fixer à la molécule HLA testée, représentant ainsi un score d'affinité pour chaque peptide. J'ai étudié, pour les allèles HLA DRB1\*1:01 et DRB1\*11:01, les peptides ayant un score prédictif  $\leq 10$  (soit une probabilité de fixation  $\geq 90\%$ ) avec la méthode recommandée par IEDB (« Consensus »). Cette méthode de prédiction utilise un algorithme basé sur plusieurs méthodes de calculs (229). En utilisant ce seuil, une première liste de peptides était obtenue avec de nombreux peptides voisins, regroupés en séries, ayant des scores similaires. Mais l'analyse

des résultats pour chaque méthode de calcul (« SMM alignement, NM alignement, Sturniolo ») révèle que pour chaque série de peptide, il existe un cœur (« core »), constitué de 9 acides aminés (ou 9 mer), responsable de l'obtention du bon score de fixation. Cette séquence « core » correspond à la partie du peptide ancrée au sein de la poche des molécules HLA-DR. Aussi, seuls les peptides de 15 acides aminés ayant une séquence « core » localisée parfaitement en leur centre, soit encadrée par 3 acides aminés en N-terminal et 3 acides aminés en C-terminal, étaient finalement retenus dans mon approche. Ce mode de sélection a permis de limiter fortement le nombre de peptides à tester, avec pour l'allèle HLA DRB1\*01:01, l'obtention d'une liste de 15 peptides (après exclusion de 2 peptides localisés dans le prodomaine d'A13) avec des séquences « core » de 9 mer uniques, contre initialement une liste de 99 peptides prédits comme ayant une forte affinité (score  $\leq 10$ ). Aussi, je n'ai pas tenu compte du score obtenu entre les différents HLA dans la sélection des peptides.

- La deuxième étape est une validation biochimique *in vitro* des peptides, synthétisés avec une pureté de 80%. En collaboration avec le Dr B. Maillère, des tests ELISAs compétitifs (« HLA Binding ») mesurant la capacité des peptides à fixer différentes molécules HLA-DR étaient réalisés. Dans ces expériences utilisant un automate, la capacité de chaque peptide à déplacer la fixation d'un peptide de référence biotinylé, spécifique de la molécule HLA d'intérêt, est mesurée de manière concentration-dépendante. Les peptides de référence sont des peptides issus d'agents infectieux qui diffèrent entre eux selon l'allèle de la molécule HLA considérée (ex : peptide issu de l'hémagglutinine (HA) du virus de la grippe pour HLA DRB1\*01:01). Après incubation et neutralisation, la quantité de peptide biotinylé et fixé aux molécules HLA, peut être mesurée par fluorométrie après réaction avec un conjugué streptavidine-alkaline phosphatase. La concentration conduisant à un déplacement de 50% du peptide de référence indique l'affinité du peptide testé ( $CI_{50}$ ). Un score d'affinité (ratio de la concentration mesurée pour chaque peptide candidat sur la concentration obtenue avec le

peptide de référence) était alors calculé et les peptides étaient considérés comme fortement affins lorsque ce score d'affinité relative était inférieur à 20.

- La troisième étape est une validation *in vitro* et *ex vivo* de la reconnaissance des peptides issus d'A13 par des lymphocytes T CD4+.

\* Tout d'abord, en collaboration avec le Dr Yu-Chun Lone (INSERM U1014, Villejuif), un modèle murin, nommé « SureL1 », transgénique, invalidé pour le CMH murin de classe I et II (IA $\beta$ -/-,  $\beta$ 2m-/-) et humanisé pour l'HLA A2.1 et DRB1\*01:01 (230), a été immunisé avec de l'A13 humaine recombinante (forme pré-commerciale, fournie par Baxter®). Pour cela, une injection sous-cutanée de 150  $\mu$ g d'A13 recombinante en émulsion avec de l'adjuvant complet de Freund était réalisée suivie 15 jours plus tard, d'une deuxième injection sous-cutanée de 150  $\mu$ g d'A13 en émulsion avec de l'adjuvant incomplet de Freund. Les souris transgéniques sont reconnues comme étant de bons reflets de la physiopathologie humaine, pour la caractérisation des épitopes T dérivés d'agents pathogènes ou de protéines thérapeutiques (231). Dans une première approche, des tests de prolifération mesuraient l'incorporation de thymidine tritiée radioactive d'une population cellulaire polyclonale de splénocytes et des cellules des ganglions lymphatiques drainant, en contact avec les différents peptides caractérisés précédemment ou avec un agent activateur non spécifique : la concanavaleine A (témoin positif). En cas de reconnaissance d'un des peptides, d'avantage de cellules prolifèrent et incorporent la thymidine tritiée ; la mesure de la radioactivité émise par la culture cellulaire permet de calculer des index de prolifération (radioactivité obtenue pour un peptide / radioactivité obtenu avec le véhicule (témoin négatif)). Les peptides permettant d'obtenir, en duplicat, un index > 3 étaient considérés comme reconnus par les lymphocytes T CD4+ murins.

\* Par la suite, à partir d'autres souris « SureL1 » immunisées, des hybridomes T étaient obtenus après fusion avec un partenaire de fusion (lignée cellulaire lymphoïde BWZ36,

n'exprimant pas de TcR, ni l'enzyme Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase) en présence de polyéthylène glycol (PEG). Après culture en milieux sélectifs avec présence d'hypoxanthine-aminoptérine-thymidine (HAT) puis d'hypoxanthine-thymidine (HT), 99 lignées d'hybridomes T ont été générées.

Ils ont ensuite été sélectionnés pour leur spécificité envers A13, à l'aide de tests de stimulation avec la protéine complète recombinante humaine, identique à celle injectée préalablement chez les souris. Pour cela, des tests de stimulation étaient entrepris, consistant à incuber en triplicat, un antigène (A13, témoins positif et négatif) avec une quantité fixe d'hybridomes T et une quantité fixe de splénocytes (ratio 10 :1) issus de souris « SureL1 » et inactivés par de la mitomycine C. Lorsque l'hybridome T reconnaît, via son TcR, sa cible antigénique, représentée par la molécule HLA DR1 chargée avec un peptide dérivant de la protéine A13, il est activé et produit de l'Interleukine 2 (IL<sub>2</sub>), qui est détectée par test ELISA, dans les surnageants de culture.

Après obtention d'hybridomes T spécifiques d'A13, les peptides étaient testés à leur tour, individuellement pour différentes lignées d'hybridomes (n=6). Cette fois, les splénocytes étaient remplacés par des cellules présentatrices d'antigène artificielles HLA DRB1\*01:01 (ratio 10 :1), chargées avec les différents peptides d'intérêt. Les taux d'IL<sub>2</sub> produite sont comparés entre chaque peptide, avec le véhicule (témoin négatif) et avec la concanavaline A (témoin positif). Des index de stimulation (taux d'IL<sub>2</sub> peptide / taux d'IL<sub>2</sub> du témoin négatif) étaient calculés et les peptides permettant d'obtenir un index > 3 étaient considérés comme reconnus par l'hybridome spécifique d'A13 testé. Différents sous-clones étaient alors sélectionnés par dilution limite et des tests de stimulation supplémentaires avec des variations de séquences des peptides retenus ont permis de préciser avec exactitude la séquence « core » du peptide reconnu par l'hybridome T. Dans des expériences supplémentaires, des MoDCs, issues de donneurs sains HLA DRB1\*01:01, incubées avec la protéine A13 humaine

recombinante entraînaient également l'activation des hybridomes T spécifiques. Cet ensemble d'expériences permet de vérifier que le peptide est bien obtenu et présenté par des cellules présentatrices d'antigène humaines, après internalisation, digestion et apprêtement de la protéine complète A13.

\* Enfin, les peptides issus d'A13 étaient testés avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de donneurs sains et de patients atteints de PTT, d'HLA-DR1 et DR11. Différents protocoles de stimulation ont été essayés, nécessitant des étapes d'amplification préalables des PBMCs, y compris chez les patients. Des lignées cellulaires de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont été obtenues après 2 cycles de stimulation (protocole acDC puis stimulation par MoDCs chargées à J10), sélectionnées sur leur capacité à sécréter de l'IFN- $\gamma$  en contact d'un mélange de peptides candidats. Après une dernière étape d'amplification (= prolifération non spécifique après stimulation par IL<sub>2</sub>, Interleukine 4 (IL<sub>4</sub>), Ac anti-CD3 et cellules nourricières allogéniques irradiées), les lignées obtenues étaient évaluées par des tests ELISPOT de détection d'IFN- $\gamma$ . La capacité à induire la sécrétion d'IFN- $\gamma$  chez les lignées cellulaires obtenues était déterminée pour chaque peptide individuellement, présentés par des cellules présentatrices d'antigènes artificielles HLA DR1 ou DR11 (ratio 10 :1). Un peptide était considéré comme reconnu par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en cas de sécrétion significative d'IFN- $\gamma$ , soit un nombre de spot produits (CFS), rapportés pour 10<sup>6</sup> lymphocytes, supérieur au double du nombre de spots obtenus avec le témoin négatif et avec un minimum de 100 CFS/10<sup>6</sup> cellules en valeur absolue. De nouveaux tests ELISPOT de confirmation étaient alors effectués pour les peptides positifs, chargés et présentés cette fois par des MoDCs irradiées provenant d'un donneur sain HLA DRB1\*01:01/03:01 ou HLA DRB1\*11:01/15:01.

### 3) Forces et limites de la méthode utilisée

Afin de déterminer l'épitope T d'un antigène protéique, il suffit de tester tous les peptides chevauchants (décalés par 1 acide aminé) couvrant l'ensemble de la séquence de cette protéine, pour leur capacité à induire une stimulation des lymphocytes T spécifiques de cet antigène pour un allèle HLA donné. Cependant, en fonction de la longueur de l'antigène étudié et du budget consacré, une étape préalable de sélection des peptides candidats à tester, peut être envisagée. Certains auteurs ont exclu certains peptides en utilisant un décalage de quelques acides aminés (jusqu'à 10 acides aminés, entre 3 et 5 généralement) entre chaque peptide, au risque de ne pas tester le répertoire complet de peptides. Afin de réduire ce risque, il est possible de prédire informatiquement, *in silico*, les peptides susceptibles d'être reconnus par les lymphocytes T spécifiques de l'antigène.

### 1. Etape *In silico*

Différents algorithmes de prédiction des peptides ont été développés et sont disponibles via internet, parfois via des logiciels payants. Ils sont basés principalement sur le même postulat de départ suggérant que les peptides dérivés d'un antigène doivent être exprimés de façon stable au sein des molécules HLA pour être présentés et reconnus de manière satisfaisante par les lymphocytes T. Ainsi, ces peptides devraient posséder une forte affinité avec les molécules HLA. Ces algorithmes fournissent pour chaque peptide, un résultat de prédiction d'affinité pour un allèle HLA donné. La séquence des molécules HLA est connue et génétiquement déterminée, sa composition modifie les interactions entre le peptide et la molécule HLA, ce qui explique les variations d'affinité pour un même peptide entre les différents allèles HLA.

J'ai utilisé l'outil en ligne IEDB car il présente plusieurs avantages (pour revue : (219,232)) : il est gratuit et combine plusieurs algorithmes de prédiction pour un large nombre d'allèles HLA. A partir de la composition en acide aminé des peptides et de leurs propriétés

biochimiques (forces électrostatiques, propriétés acido-basiques, encombrement stérique), le logiciel établit un score prédictif d'affinité avec la molécule HLA testée. Cet outil a été validé pour un grand nombre d'antigène, dont des protéines plasmatiques humaines, par des expériences *in vitro* et *in vivo* testant les affinités peptides / molécules HLA. Ces données biologiques sont répertoriées sur le site et permettent d'implémenter les résultats calculés. Cependant, contrairement à d'autres algorithmes, le logiciel d'IEDB ne prend pas en compte les affinités avec les enzymes de digestion connues pour l'apprêtement des peptides avec les molécules HLA, néanmoins l'influence de ce paramètre reste indéterminée et discutée.

L'intérêt de l'utilisation d'une étape *in silico* préalable aux analyses biologiques est principalement économique : il permet de limiter le nombre de peptide à tester, en particulier pour l'identification d'épitope de longues protéines, telles qu'A13 ou le Facteur VIII. Cette économie d'argent (en réactifs) et de temps passé (pour les expériences de laboratoires) doit être mis en balance avec l'efficacité de la méthode utilisée et le risque de rater certains peptides non sélectionnés par l'algorithme. Dans les étapes préliminaires de ces travaux, j'ai validé cette approche de prédiction par l'étude des peptides issus du Facteur VIII en comparaison avec les données expérimentales d'un travail de recherche publié par Steinitz *et al.* (231). Un excellent niveau de concordance a été obtenu avec une courbe de sensibilité/spécificité (courbe ROC) dont l'aire sous la courbe est de 0,90. En particulier, tous les peptides retrouvés expérimentalement comme étant immunodominants, étaient prédits par notre exploitation du logiciel IEDB (non publié, Annexe 4). La valeur prédictive positive n'est cependant pas parfaite et les prédictions *in silico* peuvent être surestimées avec le risque de sélectionner des peptides qui n'activent pas les lymphocytes T (233).

Dans le cadre du PTT acquis, en raison de l'existence d'une restriction HLA forte pour l'HLA DR11, il semble licite de se limiter à cet HLA pour la détermination des épitopes T d'ADAMTS13. Cependant, les allèles HLA DQB1\*03 et DQB1\*02 :02 ont également été

retrouvés plus fréquemment associés chez les patients atteints de PTT acquis tandis que l'HLA DR4 serait protecteur (211–213). Je me suis focalisé sur les HLA DR1 et DR11, principalement en raison de contraintes budgétaires et techniques (modèle murin HLA DR1), mais l'HLA DR1 est fréquemment retrouvé en France avec 15 à 30% des caucasiens (234) et une prévalence assez élevée, estimée à 18% chez les patients (211).

Aussi, je n'ai pas sélectionné les peptides pour leur capacité d'affinité d'un maximum d'allèle HLA (« promiscuity »). L'objectif d'identifier un épitope partagé (« promiscuous »), commun à plusieurs HLA, répond à une autre problématique (par exemple : tester l'immunogénicité de la protéine recombinante thérapeutique), qui n'était pas le but poursuivi ici. Cependant, en utilisant l'outil de prédiction d'IEDB, on peut voir que le peptide 1239-1253 possède une bonne affinité pour plusieurs HLA DR (Tableau 2 Article 1). On retiendra également que le peptide FINVAPHAR retrouvé par le groupe de Voorberg est contenu dans la séquence du peptide 1325-1339 (CRLFINVAPHARIAI), présent dans la liste de peptides prédits comme de forte affinité pour les molécules HLA DR1 et DR11 avec des scores prédictifs d'affinité de 1,99 et 3.69 respectivement (Tableau 1 Article 1 et Tableau 5). Ces résultats renforcent la validité de notre approche.

## 2. Validation biochimique *in vitro* des peptides par test ELISA compétitifs

L'objectif de cette étape est de restreindre d'avantage la liste de peptides candidats, en ne retenant que les peptides ayant une fixation significative avec les molécules HLA testées. Réalisée au sein du laboratoire du Dr B. Maillère (CEA, Saclay), la méthode utilisée ici est robuste, automatisée et bénéficie d'une longue expérience avec de nombreuses publications dans le domaine pour déterminer l'immunogénicité de divers composants protéiques (235,236). Les peptides de référence utilisés pour déterminer le seuil de fixation, sont des

peptides dérivant d'antigène viral (grippe), ils ont été sélectionnés pour leur capacité à discriminer des niveaux de fixation significative à des concentrations précises. Toutes les expériences sont réalisées en triplicat, avec une faible variation inter-expérience des résultats. J'ai considéré que les affinités relatives étaient significatives si les ratios de  $CI_{50}$  entre le peptide testé et le peptide de référence (HA<sup>306-318</sup> pour HLA DR1 et DR11) étaient inférieurs à 20. La détermination de ce seuil de significativité est empirique, basée sur de précédentes expériences de l'équipe de B. Maillère, soulignant l'importance de l'expertise dans ce type d'expérimentation.

La synthèse des peptides utilisés a été externalisée auprès de l'entreprise chinoise GL Biochem<sup>®</sup>, sélectionnée pour ses bas-coûts et la rapidité d'exécution des commandes. Ils ont été synthétisés à un degré de pureté de 80% et sont fournis en poudre, avec un certificat d'analyse spectrométrique permettant de vérifier la qualité du peptide obtenu. Chaque peptide a été minutieusement resolubilisé à 4°C dans l'eau + DMSO (10%), sous hotte à flux laminaire PSM II, à la concentration mère de 1 mmol/L. De multiples *aliquots* à 10 µmol/L ont été conservés à -80°C. Le peptide 1239 a également été synthétisé par un autre fournisseur européen, avec un degré de pureté de 95% et les différentes expériences ont été recommencées avec ce peptide, afin de s'assurer de l'absence de contamination des échantillons et de faux résultat positif. L'ensemble de ces précautions méthodologiques assure une bonne validité technique de nos résultats.

Au total, pour sélectionner des peptides candidats d'A13, j'ai privilégié cette méthodologie principalement en raison de son plus faible coût, tout en essayant de réduire au maximum les erreurs techniques (expériences en triplicat, 2 fournisseurs de peptide, coopération avec un groupe expert dans le domaine) et tactiques (validation pour le Facteur VIII). Néanmoins, l'approche utilisée par le groupe de Voorberg (cf. chapitre D.5 Introduction) consistant en une analyse par spectrométrie de masse est théoriquement plus proche de la réalité biologique

(233). Elle permettrait d'obtenir une plus grande exhaustivité concernant l'identification des peptides, ou tout du moins, de ne retenir que les principaux peptides impliqués, sous réserve d'une puissance suffisante avec l'analyse d'un nombre minimum de donneur de cellules HLA. Néanmoins, quelle que soit la méthode employée, une étape supplémentaire, biologique *in vitro* et *in vivo* de stimulation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est nécessaire afin de valider les peptides candidats.

### 3. Validation *ex vivo* et *in vivo* des peptides

#### \* Modèle murin et hybridomes

L'utilisation du modèle murin « SureL1 » transgénique pour la molécule HLA DR1 a été motivé par l'indisponibilité d'une souche transgénique HLA DR11, pourtant utilisée de façon satisfaisante dans des expériences d'épitope mapping (237). La souche « Sure L1 », développée par le Dr Yu-Chun Lone (Institut Pasteur, Paris) avait déjà été utilisée au laboratoire pour des expériences d'immunisation contre le Facteur VIII, également pour le développement d'hybridomes T ((238), annexe 5).

Après administration sous-cutanée d'A13 recombinante humaine, les souris ont développé une réaction allo-immune dirigée contre A13, telle que démontrée par la présence d'un anticorps murin, avec une réponse dose-dépendante, identifié par un test ELISA commercial. Un test de prolifération des splénocytes et des cellules présentes dans les ganglions lymphatiques drainant de 2 souris immunisées, a mis en évidence une réponse de ces cellules contre certains peptides. Nous avons choisi un test d'incorporation à la thymidine tritiée radioactive, car il permet l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons, en triplicat. C'est un test robuste, dont la réalisation complexe est bien maîtrisée dans le laboratoire, avec une bonne reproductibilité des résultats, mais qui peut manquer de sensibilité et qui ne permet

pas d'identifier ou de caractériser les cellules ayant proliféré, celles-ci étant éliminées lors de la réalisation du test. Ainsi, tous les peptides synthétisés (n= 17) ont été testés individuellement, y compris les peptides qui n'avaient pas obtenu un score d'affinité satisfaisant lors des tests HLA Binding. Les résultats ont montré une prolifération significative en présence de 2 peptides dérivés d'A13, la protéine complète a entraîné une prolifération mais restant néanmoins sous le seuil de significativité. Un ratio de 2 comme seuil de significativité a été choisi, empiriquement, ce qui est habituellement utilisé afin d'obtenir une bonne spécificité et sensibilité dans notre expérience. Les 2 peptides identifiés ici (1239-1253 et 1355-1369) avaient obtenu, lors des tests HLA binding, un score d'affinité significativement supérieur à celui du peptide de référence. Ces résultats permettent de valider notre méthode de sélection des peptides avec la mise en évidence de plusieurs peptides candidats. De plus, le peptide 1239-1253 est reconnu par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> murins des souris transgéniques HLA DR1.

Dans un deuxième temps, suivant la même procédure d'immunisation, j'ai réalisé des hybridomes T CD4<sup>+</sup> dirigés contre A13 selon la méthode développée par N. Shastri et sur les conseils fournis par J. Robinson (Newcastle). Les cellules murines sont fusionnées avec des cellules partenaires BWZ36, dérivées d'une lignée murine de lymphome T n'exprimant pas de TcR mais transfectée avec le gène rapporteur LacZ, inductible par l'activation de NFAT (nuclear factor of activated T cells) (239). Ces outils avaient été testés avec succès dans le laboratoire, vis-à-vis du Facteur VIII ((238), annexe 5). Vingt-six hybridomes ont été sélectionnés pour leur capacité à sécréter *in vitro* de l'IL<sub>2</sub> murine en présence de la protéine recombinante A13 humaine, présentée par des splénocytes issus d'autres souris Sure L1 naïves d'immunisation. J'ai utilisé un test ELISA commercial pour mesurer la quantité d'IL<sub>2</sub> des surnageants de culture et un hybridome était considéré comme spécifique d'A13 lorsque le ratio de concentration vis-à-vis du contrôle négatif était supérieur à 2. J'ai privilégié cette

analyse régulièrement pratiquée au laboratoire, pour son excellente reproductibilité, avec une bonne sensibilité. Après sous-clonage des hybridomes, j'ai testé individuellement les peptides identifiés précédemment. En raison du nombre important de peptides et d'hybridomes et, pour des raisons également économiques, j'ai privilégié l'utilisation de cellules présentatrices d'antigènes artificielles HLA DR1 récemment développées par J-B. Latouche (240). Celles-ci dérivent d'une lignée de fibroblastes murins NIH-3T3, transfectée avec une molécule HLA DRB1\*01:01 et les molécules de costimulation B7.1, ICAM-1 et LFA-3. **De façon surprenante, seul le peptide 1239-1253 a entraîné une sécrétion significative d'IL<sub>2</sub> chez les 6 lignées d'hybridomes testées.** La séquence de l'épitope a été plus précisément caractérisée pour 2 sous-clones d'hybridome, suite à la réalisation de nouveaux tests de stimulation avec les peptides chevauchants allant des acides aminés 1235 à 1256. La séquence minimale (« core ») du peptide reconnue par les 2 lignées d'hybridomes T, après présentation par les molécules HLA DR1, est la suivante : <sup>1241</sup>MLLLWGRLTWR<sup>1251</sup>.

Les résultats obtenus avec les cellules présentatrices d'antigène artificielles ont été vérifiés avec des splénocytes de souris Sure L1 et des MoDCs issues d'un donneur sain HLA DR1. Cet outil a fait l'objet de validations préalables, notamment pour le Facteur VIII ; les cellules ne produisent pas d'IL<sub>2</sub> et ne nécessitent pas d'inactivation par la mitomycine C. Elles se sont néanmoins montrées incapables d'entraîner une stimulation avec la protéine recombinante A13 complète. Cela est probablement dû à son incapacité de l'internaliser, de par l'absence de MMR ou CD206 (130,241) à leur surface. Cette hypothèse nous a également été suggérée lors d'expériences d'endocytose d'A13 marquée avec un fluorochrome, explorées par cytométrie en flux ((242) annexe 6 et données non publiées concernant les CPAA).

J'ai également recommencé l'élaboration d'hybridomes à partir d'une souris Sure L1 croisée avec une souche de souris invalidée pour A13 (144), fournie par D. Motto, afin d'obtenir une allo-immunisation sans interférence avec le répertoire T naturel murin. En effet, la protéine

A13 est exprimée chez la souris avec un degré d'homologie d'environ 70% et l'allo-immunisation de souris par la protéine humaine, pourrait avoir sélectionné le peptide 1239-1253, consécutivement à une forte différence de séquence avec la protéine murine et le répertoire T des souris. Cependant, j'ai obtenu des résultats similaires avec le même et unique peptide 1239-1253, reconnu par les hybridomes T issues de ces souris. De plus, l'analyse de la séquence d'A13 murine montre une forte homologie dans cette région ; seuls 2 acides aminés diffèrent dans la séquence murine pour ce peptide : QLLWGRFTWR (132). Concernant un éventuel manque de sensibilité du test ELISA de détection de l'IL<sub>2</sub> dans les surnageants de culture d'hybridome, j'ai effectué par la suite les mêmes tests de stimulation des hybridomes avec analyse chromogénique de la sécrétion de  $\beta$ -galactosidase (gène LacZ). Cette sécrétion est inductible par l'activation de NFAT après reconnaissance du peptide par le TcR des hybridomes, mais aucun autre peptide supplémentaire n'a été identifié par ce moyen (résultats non montrés). J'ai également renouvelé les stimulations de lignées d'hybridomes T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'A13, issus des souris Sure L1 (HLA DR1) avec l'ensemble des peptides identifiés *in silico* pour l'HLA DR11 (n= 48) mais je n'ai pas mis en évidence d'autre peptide que le peptide 1239-1253 (données non montrées).

Au total, lors de la génération des hybridomes, il est possible qu'un biais de sélection de peptides m'est empêché d'identifier plusieurs peptides comme lors des tests de prolifération des splénocytes murins mais il n'a pas été possible d'identifier ce biais. Cependant, en l'absence de possibilité d'immortaliser des lymphocytes T humains et/ou de créer des hybridomes T humains, ces hybridomes T murins sont une aide importante pour l'identification de l'épitope T d'A13. Ils constituent des outils incontournables pour tester son immunogénicité ou celle de ses variants, en cas de modification par biologie moléculaire à visée thérapeutique.

\* Validation chez l'homme.

Après l'identification de peptides présentés par les molécules HLA, l'analyse la plus importante demeure l'obtention d'une réponse chez des lymphocytes T humains. Ainsi, en parallèle des expériences chez la souris, de multiples essais de stimulation de lymphocytes T ont été entrepris chez des donneurs sains et des patients atteints de PTT acquis d'HLA DR1 et DR11. Les prélèvements sanguins ont été traités en respectant les règles pré-analytiques de qualité recommandées, afin d'optimiser les résultats (243). Plusieurs protocoles différents ont été essayés sans succès : avec amplification préalable spécifique ou non spécifique (244,245), par la protéine recombinante ou par des pools de peptides, sur PBMCs fraîches ou congelées, chez des patients au diagnostic ou en rémission, avec différentes méthodes d'analyse: par incorporation à la thymidine tritiée, détection de la sécrétion d'IL<sub>4</sub>, d'IFN- $\gamma$  ou d'IL<sub>2</sub>, par test ELISA ou par cytométrie de flux. Cela est probablement dû à la rareté des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> incriminés dans la réponse auto-immune anti-A13 dans le sang circulant. Dans le contexte d'ADAMTS13, il semble donc nécessaire de réaliser au préalable des lignées T spécifiques de l'ensemble des peptides dérivés d'A13. Pour cela, j'ai utilisé la méthode acDC pour ses aspects pratiques : plus rapide, pas de mise en contact avec des cellules d'autres individus (éliminant le risque d'une immunisation allogénique) et présentation des peptides par les MoDCs humaines (autologues). Les aspects techniques de cette méthodologie ont été optimisés par l'équipe de R. Mallone, qui est spécialisé dans l'immunologie du diabète, pathologie auto-immune avec réponse cellulaire T cytotoxique (et donc Th1) prédominante. Cependant, lors de la mise au point du protocole acDC, des réponses contre d'autres antigènes ont également été obtenus de façon satisfaisante, dont plusieurs agents infectieux nécessitant une réponse Th2 (218).

Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir des lignées sélectionnées pour les réponses vis-à-vis de la protéine A13 complète (données non montrées), nous avons utilisé le pool de peptides. En effet, la réponse obtenue après stimulation avec la protéine entière est bien moins

importante qu'avec les peptides, comme je l'avais observée avec les hybridomes. Cette limite méthodologique est commune à de nombreux antigènes et limite forcément notre analyse avec un risque de manque de sensibilité et de « rater » des peptides.

J'ai ensuite sélectionné les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sécréteurs d'IFN- $\gamma$  via le kit commercial MILTENYI® au 10<sup>ème</sup> jour de la stimulation acDC, afin d'établir des lignées. Les lignées étaient par la suite stimulées vers J32 par des MoDCs de donneur sain de même HLA (DR1 ou DR11) irradiées, chargées avec les pools de peptides préalablement déterminés. J'ai détecté la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par ELISPOT, qui est actuellement une des méthodes de détection les plus sensibles avec un bon niveau de reproductibilité et offrant de plus la possibilité de réutiliser les cellules testées (246–249). Le choix de l'IFN- $\gamma$  a été établi après avoir essayé le kit IL<sub>4</sub> qui ne retrouvait pas de réponse aussi nette lors des stimulations avec le pool de peptide (données non montrées).

Pour les tests avec les peptides individuels, j'ai utilisé les cellules présentatrices d'antigènes artificielles (DR1 et DR11) irradiées, celles-ci ne secrètent pas d'IFN- $\gamma$ . Une réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> a été obtenue avec plusieurs peptides, dont le peptide 1239, à la fois chez des donneurs sains et des patients DR1 et DR11 (Figure 3 Article 1 et Figure 7). J'ai retenu un seuil de positivité lorsque le nombre de spots observés était supérieur à 2 fois le nombre de spots obtenus avec le contrôle négatif et supérieur à 100 CFS/10<sup>6</sup> cellules, les résultats positifs observés étaient largement supérieurs à ce seuil.

On retiendra qu'il n'est pas possible d'utiliser les CPAA dès les premières stimulations, en raison du risque d'immunisation anti cellule murine. J'ai aussi confirmé que le peptide 1239 était reconnu par la lignée de lymphocytes T lorsqu'il était présenté par les MoDCs (données non montrées).

Il ne semble pas y avoir d'autre limitation technique que celles mentionnées ci-dessus dans notre approche. Néanmoins, ces résultats n'ont été validés que chez 5 individus : 1 patient en phase aigüe DR1 au diagnostic de la maladie, 2 donneurs sains DR11, 1 patient en rémission DR11 et 1 patient en phase aigüe DR11. Il n'a pas été possible de refaire ces expériences chez d'autres patients. On pourra donc se demander s'il s'agit de l'épitope T spécifique d'A13 chez les patients atteints de PTT ou s'il ne s'agit que d'une spécificité retrouvée chez quelques individus.

On regrettera aussi l'impossibilité de caractériser les lymphocytes T des lignées obtenues (profil Th1, Th2, T mémoire central ou effecteur) compte-tenu des modifications induites par les stimulations et leur culture *in vitro* prolongée. J'ai d'ailleurs également essayé d'isoler les lymphocytes T humains au moyen de tétramères HLA DR1, chargés avec le peptide 1239 (purifié à 99%) et couplés au fluorochrome PE ; obtenus via le NIH Tetramer Core Facility (Dr Altman, Atlanta, USA) (250), mais je n'ai pas été en mesure d'observer de fixation par cytométrie en flux sur les hybridomes T. Le tétramère chargé avec le peptide 1239 semble non fonctionnel avec une absence de marquage et un aspect d'agglomérats au microscope.

Au final, après de nombreux échecs, j'ai établi une méthode d'identification de l'épitope T d'A13 robuste et sensible, mais difficile, longue et coûteuse en réactifs. J'ai développé des outils utiles pour d'autres études complémentaires concernant A13 et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> anti-A13. L'isolation d'un clone, notamment par l'aide d'un tétramère HLA DRB1\*11 chargé avec ce peptide permettra de caractériser au niveau cellulaire les propriétés des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> des patients atteints de PTT acquis.

## B. Particularités des épitopes T d'ADAMTS13

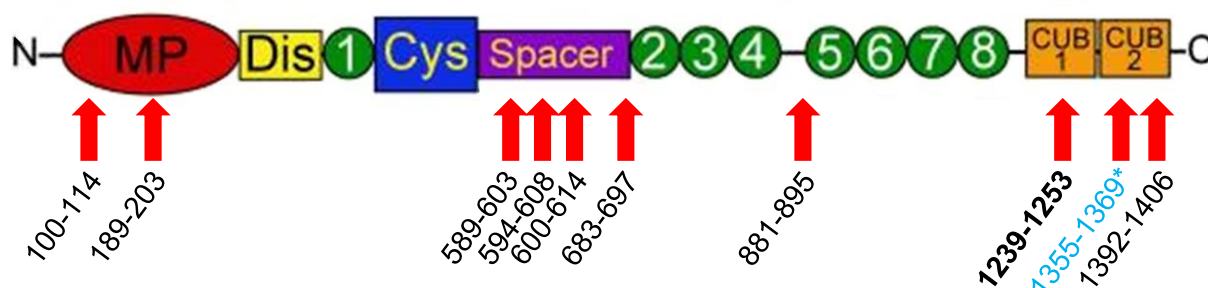
- 1) Le peptide 1239-1253 est l'épitope T dominant d'ADAMTS13 chez les patients atteints de PTT acquis

Mes travaux montrent que le peptide  $^{1239}\text{GDM}\underline{\text{LLLWGRLTWRKM}}^{1253}$  est l'épitope T dominant d'ADAMTS13 chez les patients atteints de PTT acquis. Il possède une forte affinité pour les molécules HLA DR1, DR11 et DR15. Son affinité, prédite par IEDB, semble forte pour 3 autres allèles HLA DRB1 (Tableau 2 Article 1). Il est capable d'être apprêté, présenté par des cellules présentatrices d'antigène murines et humaines à partir de la protéine A13. Enfin, il est reconnu par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris transgéniques DR1, de donneurs sains DR11 (1 sur 2 testés) et de patients DR1 (n=1) et DR11 (n=2) (Figure 3 Article 1 et Figure 7). Il s'agit donc du seul peptide reconnu par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de l'ensemble de patients étudiés ici (n= 3), de deux HLA différents. De façon intéressante, Sorvillo *et al.* a retrouvé un peptide similaire ( $^{1240}\text{DMLLLWGRLTWRK}^{1252}$ ) lors des analyses par spectrométrie de masse de MoDCs chargées avec de l'A13. Cependant, les cellules provenaient d'un donneur sain HLA DR13/DR4 et le peptide n'était pas retrouvé lors de l'analyse d'individus HLA DR11 et DR1 (216).

Parmi les 14 autres peptides possédant une forte affinité pour les molécules HLA DR1, deux autres peptides ( $^{1355}\text{ASYILIRDT}\underline{\text{HSLRTT}}^{1369}$  et  $^{1392}\text{EGFLKAQASLRGQY}\underline{\text{W}}^{1406}$ ) sont capables d'être reconnus par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> : chez la souris SureL1 pour le peptide 1355-1369 et chez un patient atteint de PTT acquis DR1 pour le peptide 1392-1406 (Tableau 1 Article 1 et Figure 2 Article 1). Ces deux peptides possèdent également une forte affinité pour les molécules HLA DR11 (Tableau 5) et le peptide 1392-1406 est également reconnu par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> d'un donneur sain DR11 (Figure 3 Article 1 / Figure 7C)

En plus des peptides 1239-1253 et 1392-1406, sept autres peptides sont également reconnus par des lymphocytes T CD4 + de patients et donneurs sains DR11 :  
<sup>100</sup>TERYVLTNLNIGAE<sup>114</sup>, <sup>189</sup>NRQVRGVTQLGGACS<sup>203</sup>, <sup>589</sup>RPLFTHLAVRIGGRY<sup>603</sup>,  
<sup>594</sup>HLAVRIGGRYVVAGK<sup>609</sup>, <sup>600</sup>GGRYVVAGKMSISPN<sup>614</sup> <sup>683</sup>RQAWVWAAVRGPCSV<sup>697</sup>  
et <sup>881</sup>PSPWGSIRTGAQAAH<sup>895</sup> (Figure 7).

Au total, mes résultats montrent que 10 peptides sont capables d'être reconnus par les lymphocytes T CD4+, murins ou humains, selon deux allèles HLA différents. Les résultats sont résumés dans la Figure 10. Ils ont été mis en évidence principalement (9 fois sur 10) dans le contexte d'une présentation par les molécules HLA DR11. Seuls 2 peptides (1239-1253 et 1392-1406) ont été reconnus par les lymphocytes T CD4+ des 2 HLA étudiés ici.



**Figure 10 :** Epitopes T d'ADAMTS13.

Les épitopes T identifiés dans ce travail sont distribués tout au long de la protéine et signalés par des flèches rouges. Le peptide 1239 est considéré comme immunodominant car retrouvé chez les 2 HLA testés et à la fois dans le modèle murin, chez des patients et des donneurs sains. \*Ce peptide a été reconnu dans le modèle murin uniquement.

Parmi les 10 peptides que j'ai identifiés, 5 peptides (589-603, 594-608, 1239-1253, 1355-1369, 1392-1406) ont une séquence similaire ou proche de ceux identifiés (n= 11) dans les travaux de l'équipe de Voorberg (Tableau 4 (216)).

## 2) Analyse des épitopes T au sein de la séquence d'ADAMTS13

Les épitopes T d'ADAMTS13 sont distribués tout au long de la séquence de la protéine avec néanmoins une prédominance pour les domaines CUB1 / CUB2 et spacer.

En étudiant la séquence des autres protéines de la famille ADAMTS (Figure 1B), on constate que parmi les épitopes T, quatre peptides sont situés dans des domaines exclusifs d'A13, qui n'existent pas dans les autres protéines de la famille ADAMTS. Il s'agit des domaines CUB 1 et 2 (peptides 1239-1253, 1355-1369 et 1392-1406) et la jonction entre les domaines TSP1 n° 4 et 5 (peptide 881-895).

Ces résultats sont également retrouvés dans les travaux de l'équipe de Voorberg avec une majorité (6/11) de peptides localisés dans les domaines CUB 1 et CUB 2 (Tableau 4 (216)).

Provenant d'une partie du génome moins conservée, ces domaines seraient moins exposés au système immunitaire, ce qui induirait une plus faible tolérance et pourrait expliquer cette localisation préférentielle.

Le peptide dominant 1239-1253 est localisé au niveau du domaine CUB 1, qui n'est pas un domaine indispensable au fonctionnement enzymatique de la protéine (90). Bien que sa fonction exacte ne soit pas complètement connue, un site de liaison du FW y est situé, ce qui entraînerait un changement conformationnel de la protéine avec passage de la forme repliée à la forme déployée, révélant le site catalytique lors d'une fixation du FW. Cette localisation permet d'envisager, pour les patients atteints de forme congénitale de PTT, le développement d'une protéine ADAMTS13 recombinante génétiquement modifiée, qui permettrait de prévenir le risque de développement d'anticorps neutralisants suite à l'administration de la protéine recombinante, sans en altérer la fonction.

A l'opposé, un deuxième site privilégié d'épitope T est localisé au niveau du domaine spacer, localisé au même niveau que l'épitope B (cf. infra). Cette localisation est d'une importance fonctionnelle capitale car elle possède le site d'ancrage du FW avant son clivage par le site catalytique (Figure 3), aussi, toute tentative de mutagenèse à ce niveau devra être particulièrement prudente au risque de produire une protéine non fonctionnelle sur le plan enzymatique.

Certains résultats ont été obtenus via l'immunisation d'un modèle murin, il est possible que les différences entre les séquences d'A13 humaine et murine et ainsi les différences de répertoire T chez les souris, aient sélectionnés l'unique peptide 1239-1253 retrouvé chez les hybridomes T spécifiques d'A13. Néanmoins, le pourcentage d'homologie entre A13 humaine et murine varie de 37 à 88% (Tableau 2). Concernant les domaines CUB 1 et CUB 2, il est plutôt élevé, autour de 69%. J'ai utilisé également une souris SureL1 croisée avec une souche invalidée pour A13 murine, afin de limiter ce biais de répertoire murin, mais les résultats ont été identiques (cf supra). Afin d'éliminer ce possible biais inter-espèce, il serait nécessaire de réitérer ces expériences en immunisant des souris transgénique DR11 et déterminer si l'on retrouve un seul épitope immunodominant, 1239-1253 ou un autre.

Par ailleurs, l'épitope 881-895 possède un site de glycosylation (mannose) au niveau du résidu Trp en position 884 et l'épitope 1355-1369 est juxtaposé au site de glycosylation du résidu Asn en position 1354 (Tableau 1). Comme cela a été montré dans la physiopathologie de certaines maladies auto-immunes (251), il est possible que ces glycosylations, en modifiant l'endocytose d'A13 (ici, via le MMR de cellules présentatrices d'antigène) ou la présentation de peptides situés à proximité, participent au mécanisme de rupture de la tolérance envers A13 dans le PTT acquis.

Dans le même esprit de recherche de facteurs favorisant la rupture de tolérance, nous avons démontré, dans le cadre d'un autre travail du laboratoire, que le complément n'était pas impliqué dans la rupture de tolérance vis-à-vis d'A13, contrairement au Facteur VIII ((242) annexe 6).

### 3) Cas des peptides $^{1328}\text{FINVAPHAR}^{1336}$ et $^{1358}\text{ASYILIRD}^{1365}$

Par une approche différente, Sorvillo *et al.* ont identifié la séquence peptidique « core » située en position  $^{1328}\text{FINVAPHAR}^{1336}$ , comme étant le peptide issu d'A13, préférentiellement présenté par les molécules HLA DRB1, issues de MoDCs de 17 donneurs sains couvrant 7 HLA différents (DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR15). Cette présentation serait également exclusive pour les HLA DR1 et DR11.

Récemment, Verbij *et al.* ont retrouvé, une réponse lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> dirigée contre les peptides  $^{1328}\text{FINVAPHAR}^{1336}$  et  $^{1358}\text{ASYILIRD}^{1365}$  en contexte HLA-DR11 et DR3 respectivement (252).

Dans cette étude, les PBMCs issues de 2 patients atteints de PTT acquis à la phase aigüe, étaient incubées pendant 24h avec ces peptides ou de l'A13 recombinante humaine (10 µg/mL) et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques étaient détectés par cytométrie de flux. Pour cela, l'expression du CD40 Ligand (CD40L ; CD154) à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> était analysée comparativement à des contrôles positifs (peptide superantigène issu d'agent infectieux) et négatifs (peptides avec séquences « core » modifiées au niveau des résidus d'ancrage). Ce marquage exploite l'expression autologue du CD40L des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> lorsque leur TcR reconnaît et se lie spécifiquement au peptide présenté par les molécules HLA.

Le taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiquement dirigés contre A13 et le peptide NAGGARLFINVAPHARIAIH était particulièrement élevé (2,6% et 4,5%) chez le patient DR11, de même que pour le peptide EGANASYILIRDTHSLRTTA (3,3%) chez un patient DR3. Néanmoins, dans ce dernier cas, la stimulation par A13 n'entraînait pas d'expression de CD40L chez les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. De façon concordante, les stimulations de PBMCs de donneurs sains DR11 et DR3 avec A13 ou les peptides n'entraînaient pas de réponse lymphocytaire. De plus, le premier patient DR11 était à nouveau testé, en rémission après splénectomie, mais aucune réaction lymphocytaire n'était observée.

Dans mes travaux, j'ai identifié un peptide similaire : <sup>1325</sup>CRLFINVAPHARIAI<sup>1339</sup> qui possède la même séquence « core ». L'affinité de ce peptide, évaluée par test ELISA compétitif est bonne pour DR11 (Tableau 5) et médiocre pour DR1 (Tableau 1 Article 1), malgré un excellent score prédictif d'affinité d'après IEDB. Je n'ai cependant pas observé de reconnaissance de ce peptide par les différents lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, murins ou humains, lors des différents tests de stimulation employés.

Ces différences pourraient s'expliquer par les différences de séquence et de longueur entre les 2 peptides, soulignant l'importance de la nature des acides aminés situées en N et C-terminal de la séquence « core » (253,254). On retiendra également que les taux de réponse lymphocytaire observés lors des stimulations avec les peptides <sup>1328</sup>FINVAPHAR<sup>1336</sup> et <sup>1358</sup>ASYILIRD<sup>1365</sup> ou A13 par Verbij *et al* étaient particulièrement élevés, contrastant avec les résultats habituellement observés dans les maladies auto-immunes et dans mes différentes expériences.

J'ai également identifié le peptide <sup>1355</sup>ASYILIRDTHSLRTT<sup>1369</sup> lors des tests de proliférations des splénocytes des souris SureL1 (HLA DR1) immunisées avec A13. Il possède une bonne affinité envers les molécules HLA DR1 et DR11 et contient la séquence « core » ASYLIRD

identifiée par le groupe de Voorberg, mais chez des donneurs sains et patients DR3. Les études concernant ce peptide nécessitent d'être poursuivies dans les autres HLA, ces résultats suggèrent néanmoins le caractère « promiscuous » de ce peptide.

#### 4) Epitope T et HLA

Au total, 63 peptides (48 pour DR11 et 15 pour DR1) ont été identifiés *in silico* mais 20 peptides seulement possèdent une forte affinité pour les molécules HLA DR11 (Tableau 5). Ainsi, le nombre de peptides de forte affinité initialement prédits par IEDB était beaucoup plus important pour l'HLA DR11 que pour DR1 (48 contre 15 respectivement).

Après réalisation des tests ELISA compétitifs, on observe un nombre beaucoup plus restreint de peptides avec une forte affinité prouvée (20 pour DR11 et 12 pour DR1) et le nombre de peptides reconnus par des lymphocytes T est bien plus important pour HLA DR11 que pour DR1 (9 contre 2).

Comme cela a été montré pour d'autres modèles expérimentaux (maladies auto-immunes ou immunité anti-infectieuse), des différences d'affinité pour le même épitope T pourraient expliquer les restrictions HLA observées (237,255). Concernant A13, chez les patients atteints de PTT acquis où DR11 est surreprésenté, on retrouve d'après mes résultats :

- de fortes similitudes entre les peptides retrouvés pour les 2 HLA étudiés: ainsi, 11 des 15 peptides prédits pour DRB1\*01 sont communs avec les peptides prédits pour DRB1\*11,

- parmi les peptides de forte affinité prouvée pour HLA DR11, six peptides (371-385, 465-479, 589-603, 1239-1253, 1355-1369 et 1392-1406) ont également une forte affinité pour les molécules HLA DR1.

Cela suggère que la prédisposition à développer un PTT chez les individus DR11 serait liée à la présentation d'un nombre plus important d'épitopes T par cet HLA. Le peptide 1239-1253, reconnu par les lymphocytes T DR1 et DR11 et également présenté par les molécules HLA DR4 / DR13 d'après Sorvillo *et al.*, serait le peptide immunodominant, nécessaire mais non suffisant pour expliquer le développement de la maladie chez les individus DR11.

Cependant, ces constatations vont à l'encontre des autres résultats obtenus par le groupe de Voorberg où le peptide 1325 serait le seul retrouvé en contexte DR11 alors qu'il serait retrouvé également par les autres HLA. La prédisposition DR11 serait alors expliquée par une présentation d'un nombre plus restreint de peptides par les molécules HLA DR11.

Il serait intéressant d'étudier les peptides présentés et reconnus chez les individus porteurs de l'HLA DR4 qui constitue un facteur protecteur de la maladie. Le rôle des autres peptides identifiés ici dans les autres HLA permettrait également de clarifier le rôle des molécules HLA dans le développement du PTT acquis.

Enfin, plus récemment, de nouveaux peptides issus d'A13 ont été identifiés par le groupe de Voorberg, selon la même méthodologie par spectrométrie de masse, utilisée dans le contexte HLA DQB1\*03 et DQB1\*02:02 (256). Ces allèles sont également des HLA plus fréquemment associés au PTT acquis et l'étude concernait 9 donneurs sains. De nouvelles analyses étaient également réalisées chez 9 donneurs sains HLA DR. Un total de 12 séquences peptidiques pour HLA DR et 8 séquences pour HLA DQ ont été retrouvées dont les peptides <sup>1328</sup>FINVAPHAR<sup>1336</sup> et <sup>1362</sup>LIRDTHSLR<sup>1370</sup> similaires aux peptides précédemment cités. Le peptide 1239-1253 n'était pas retrouvé dans ce lot d'analyses. Quatre nouveaux peptides étaient exclusivement retrouvés pour HLA DQB1 : 461-479, 497-514, 705-717 et 714-732.

Dans ce travail, des analyses *in silico*, évaluant le potentiel inducteur de réponse T régulatrice (JanusMatrix®) et T effectrice (EpiMatrix®) de différents peptides dérivés d'A13, retrouvaient

un potentiel « immunogénique » marqué pour les peptides FINVAPHAR et LIRDTHSLR. Aucune étude complémentaire impliquant des lymphocytes T CD4+ n'était néanmoins fournie. Dans ces analyses, il est retrouvé que le peptide 1239-1253 présente également un potentiel « immunogénique », confortant mes résultats.

## 5) Epitope T et épitope B

L'épitope B dominant d'A13 est connu comme étant localisé au niveau des domaines riche en cystéine et spacer d'A13 (Figure 6). Même si l'épitope T dominant (peptide 1239) est localisé au niveau du domaine CUB1, j'ai mis en évidence 4 épitopes T d'A13 localisés au niveau de ces deux domaines. Ces peptides (<sup>589</sup>RPLFTHLAVRIGGRY<sup>603</sup>, <sup>594</sup>HLAVRIGGRYVVAGK<sup>608</sup>, <sup>600</sup>GGRYVVAGKMSISPN<sup>614</sup> et <sup>683</sup>RQAWVWAAVRGPCSV<sup>697</sup>) sont de forte affinité pour les molécules HLA DR11 et ils sont reconnus par des lymphocytes T de patients et de donneurs sains DR11. On remarque que 3 d'entre eux sont extrêmement proches, même s'ils ne possèdent pas la même séquence « core ». Le peptide 589-603 (+/- 594-608) a également été retrouvé par le groupe de Voorberg avec une séquence similaire <sup>591</sup>LFTHLAVRI<sup>599</sup>, dans le contexte HLA DR7 / DR15 (Tableau 4, (216)). Bien que le mécanisme impliqué ne soit pas évident, ces résultats suggèrent que les épitopes T et B sont chevauchants, même s'il ne s'agit pas de l'épitope T dominant. Il n'a pas été possible de déterminer les caractéristiques des lymphocytes T CD4+ ayant reconnus les peptides identifiés ici mais il serait intéressant de rechercher une polarisation Th2, en fonction du peptide reconnu, qui pourrait expliquer le développement d'anticorps spécifiques.

L'identification du peptide 1239-1253 comme épitope T dominant permet d'envisager le développement de tétramères de classe II chargés avec ce peptide afin de caractériser la

réponse lymphocytaire T CD4+, mais l'utilisation d'autres tétramères, chargés avec ces autres peptides sera nécessaire afin d'explorer le lien entre épitope B et T.

La caractérisation de l'épitope B et des lymphocytes B impliqués dans le PTT acquis est d'une importance capitale dans cette pathologie, où le Rituximab est désormais utilisé en première ligne et de manière préemptive pour prévenir les rechutes (168). Il est d'ailleurs remarquable de constater que ce traitement permet d'accélérer la rémission clinique des patients à la phase aigüe. Aussi, j'ai évalué le rôle des lymphocytes B dans la présentation antigéniques et l'amplification de la réponse T antiA13. A l'aide des hybridomes T spécifiques d'A13, j'ai montré que les lymphocytes B issus de patients et de donneurs sains DR1 ne sont pas capables de stimuler les hybridomes T lorsqu'ils sont incubés avec A13 ou le peptide 1239 (résultats non présentés).

Dans un autre travail en collaboration, nous avons isolé des lymphocytes B spécifiques d'A13, grâce à de l'A13 marquée avec un fluorochrome, afin de cloner des anticorps monoclonaux (30 IgM et 5 IgG). Deux des IgG reconnaissent les domaines riche en cystéine et spacer, sans inhiber l'activité de la protéine, mais ils reconnaissent également des épitopes cryptiques permettant d'envisager un nouveau modèle de rupture de la tolérance vis-à-vis d'A13 (annexe 7 (257)).

Au total, ces explorations soulignent le fait que le PTT est une maladie auto-immune singulière dont l'étude offre l'opportunité de découvrir de nombreuses similitudes avec d'autres maladies auto-immunes.

### **C. Autres maladies auto-immunes spécifiques d'antigène**

Les maladies auto-immunes (MAI) touchent 5 à 8 % de la population mondiale (8% dans les pays développés). Il en existe environ 80, qui touchent préférentiellement les femmes à 78%. Parmi les MAI, le PTT se distingue par sa particularité d'être spécifique d'un antigène : il est défini par la présence d'un déficit acquis en ADAMTS13, consécutif à la présence d'un anticorps spécifique. Il existe d'autres maladies auto-immunes spécifiques d'antigène (MAISA - Tableau 6), mais dans le cas du PTT, la cible est plasmatique, la protéine ADAMTS13.

Historiquement, différents postulats ont été exigés pour établir le caractère auto-immun d'une maladie (258) :

1. Une preuve directe avec reproduction de la pathologie d'un individu à l'autre au sein de l'espèce humaine ou de l'homme à l'animal par transfert des autoanticorps pathogènes ou des lymphocytes T auto-réactifs,
2. Une preuve indirecte, par la reproduction de la maladie auto-immune humaine dans un modèle expérimental animal,
3. Des preuves circonstanciées, avec l'accumulation de données cliniques ou expérimentales suggestives.

Cependant, un certain nombre de pathologies reconnues comme auto-immunes ne remplissent pas ces critères. Pour leur part, bien qu'elles répondent à ces critères, les MAISA ne font pas partie d'une entité bien définie. Il s'agit d'un groupe de pathologies qui possède de nombreuses homologies, notamment pour leur traitement et on peut suspecter qu'elles présentent la même physiopathologie. Des critères plus restrictifs pourraient être proposés :

présence d'un auto-anticorps, d'isotype IgG ou IgA, provenant d'une différenciation de lymphocytes B ayant rencontré l'antigène et fait un switch de classe, avec une haute affinité après un processus de maturation et surtout **possédant une activité pathogénique**, prouvée *in vitro* ou mieux, *in vivo* dans des modèles animaux, avec reproduction de la pathologie après transfert passif d'anticorps. En cela, de nombreux anticorps sont caractéristiques d'une pathologie mais ne sont que des marqueurs sérologiques, ces pathologies sont auto-immunes mais ne sont pas des MAISA. D'autres critères tels que la présence d'une restriction HLA et une efficacité des plasmaphérèses et/ou des immunosuppresseurs dont le rituximab découlent des précédents points.

Dans le tableau 6, une liste non-exhaustive des MAISA est donnée à titre indicative.

De nombreuses MAISA sont des maladies rares et de ce fait, l'identification des facteurs de risque génétiques et environnementaux associés à ces pathologies est difficile. Concernant les MAI les plus fréquentes, qui ont bénéficié d'études génétiques et épidémiologiques d'ampleur, on retiendra que la sclérose en plaque possède certaines caractéristiques d'une MAISA mais l'antigène n'a pas été identifié à ce jour, malgré de nombreuses tentatives. Les anticorps anti-ADN natifs et anti peptides citrullinés sont des marqueurs spécifiques de lupus et de la polyarthrite rhumatoïde respectivement, mais ils ne possèdent pas de pouvoir pathogène, et ces pathologies ne sont pas des MAISA.

| <b>NOM Maladie</b>                                   | <b>Cible Antigénique</b>                                                                                                          |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Basedow                                              | Récepteur TSH (TRAK)                                                                                                              |
| Hashimoto                                            | Thyropéroxydase (TPO)<br>Thyroglobuline (TG)                                                                                      |
| Maladie Coeliaque                                    | Gliadine<br>Transglutaminase<br>Endomysium                                                                                        |
| Biermer                                              | Facteur Intrinsèque (FI)<br>Cellules pariétales gastriques (CPG)                                                                  |
| Dermatomyosite                                       | MDA-5<br>NXP-2<br>SAE<br>TIF-1 $\gamma$<br>Mi-2                                                                                   |
| Myopathie nécrosante auto-immune                     | Hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (HMGCoAR)<br>Signal recognition particle (SRP)                                       |
| Antisynthétase                                       | Jo1, PL7, PL12, OJ, EJ, Zo, KS, YRS                                                                                               |
| Anémie hémolytique Auto-immune                       | Globule rouge                                                                                                                     |
| Purpura thrombopénique Immunologique                 | Plaquettes > GPIIbIIIa                                                                                                            |
| PTT                                                  | ADAMTS13                                                                                                                          |
| Guillain Barré                                       | Gangliosides                                                                                                                      |
| Miller-Fischer                                       | GQ1b                                                                                                                              |
| Encéphalite auto-immune                              | N-méthyl-D-aspartate (NMDA)                                                                                                       |
| Lambert-Eaton                                        | Canaux calciques voltage-dépendants (CCVD) de type P/Q                                                                            |
| Myasthénie                                           | Récepteur Acétylcholine (RAch)<br>Kinase spécifique des muscles (MuSK) Protéine 4<br>reliée au récepteur des lipoprotéines (LRP4) |
| Devic                                                | Aquaporine 4 (AQP4)                                                                                                               |
| Isaac                                                | Canal potassique voltage-dépendant (VGKC)                                                                                         |
| Good Pasture                                         | Membrane basale glomérulaire (MBG) : domaine NC1<br>du réseau alpha-3 du collagène du type IV                                     |
| Glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM)            | Récepteur de la phospholipase A2 (PLA2R)                                                                                          |
| Vascularite à ANCA de type polyangéite microscopique | Myéloperoxydase (MPO)                                                                                                             |
| Syndrome des anti-phospholipides                     | $\beta$ 2GP1, cardiolipide                                                                                                        |
| Hémophilie acquise                                   | Facteur VIII                                                                                                                      |
| Epidermolyse bulleuse acquise                        | Collagène 7                                                                                                                       |
| Pemphigus                                            | Desmoglénines 1 et/ou 3                                                                                                           |
| Pemphigoïde bulleuse                                 | Membrane basale dermo-épidermique (BPAG1-2)                                                                                       |

**Tableau 6 :** Liste des Maladies auto-immunes spécifiques d'Antigène (MAISA) et cible antigénique reconnue par les anticorps.

D'importants progrès techniques ont été réalisés au cours des vingt dernières années notamment par l'étude de maladies infectieuses, dont l'infection par le VIH (259), ou dans des modèles animaux, en particulier transgéniques (237), ayant permis l'identification et la caractérisation des épitopes B et T impliqués dans de nombreuses pathologies, dont les MAISA. L'objectif est d'identifier et caractériser les lymphocytes B et T impliqués afin de comprendre l'origine de ces pathologies et d'envisager des thérapeutiques ciblées. Aussi, on peut se demander la pertinence des modèles animaux de la SEP et de la PR qui font appel à une immunisation dirigée contre un antigène bien établi (MBP et collagène A2 respectivement), sans lien avec la pathologie chez l'homme. Dans le même temps, de nombreuses découvertes en biologie et immunologie fondamentale ont été appliquées à l'étude des MAI (lymphocytes Treg ou Th17, Toll-Like Receptor, études transcriptomiques et génomiques,...). A mon sens, la validité et la signification des études immunologiques ayant porté sur des MAI non MAISA est hasardeuse.

Mes travaux sur ADAMTS13 permettent d'envisager des études sur les lymphocytes T spécifiques d'ADAMTS 13 directement impliqués dans la physiopathologie des patients atteints de PTT acquis. Ainsi, sur le plan thérapeutique, le mécanisme d'action et l'efficacité de traitements immunosuppresseurs pourrait être déterminée au laboratoire pour certaines MAISA et les résultats de ces études pourraient être appliqués sans difficulté à d'autres MAISA. On retiendra d'ailleurs que le Rituximab, anticorps monoclonal ciblant les lymphocytes B, est un traitement efficace et régulièrement utilisé pour de nombreuses MAISA mais il n'a pas été possible de démontrer son efficacité dans le lupus.

L'ensemble de ces éléments suggère qu'il est important de revoir les stratégies d'étude et de traitement des MAISA.

## V – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Moschcowitz, E. Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries; an hitherto undescribed disease. *Proc N Pathol Soc.* 1924;24:21–4.
2. Moschcowitz E. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries; an undescribed disease. *Am J Med.* 1952 Nov;13(5):567–9.
3. Gore I. Disseminated arteriolar and capillary platelet thrombosis; a morphologic study of its histogenesis. *Am J Pathol.* 1950 Jan;26(1):155–75, incl 4 pl.
4. Jaffe EA, Nachman RL, Merskey C. Thrombotic thrombocytopenic purpura--coagulation parameters in twelve patients. *Blood.* 1973 Oct;42(4):499–507.
5. Rubinstein MA, Kagan BM, Macgillviray MH, Merliss R, Sacks H. Unusual remission in a case of thrombotic thrombocytopenic purpura syndrome following fresh blood exchange transfusions. *Ann Intern Med.* 1959 Dec;51:1409–19.
6. Bukowski RM, Hewlett JS, Harris JW, Hoffman GC, Battle JD, Silverblatt E, et al. Exchange transfusions in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 1976 Jul;13(3):219–32.
7. Pisciotta AV, Garthwaite T, Darin J, Aster RH. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura by exchange transfusion. *Am J Hematol.* 1977;3:73–82.
8. Lian EC, Harkness DR, Byrnes JJ, Wallach H, Nunez R. Presence of a platelet aggregating factor in the plasma of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and its inhibition by normal plasma. *Blood.* 1979 Feb;53(2):333–8.
9. Byrnes JJ, Khurana M. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma. *N Engl J Med.* 1977 Dec 22;297(25):1386–9.
10. Bukowski RM, King JW, Hewlett JS. Plasmapheresis in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1977 Sep;50(3):413–7.
11. Remuzzi G, Misiani R, Mecca G, de Gaetano G, Donati MB. Thrombotic thrombocytopenic purpura--a deficiency of plasma factors regulating platelet-vessel-wall interaction? *N Engl J Med.* 1978 Aug 10;299(6):311.
12. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1982 Dec 2;307(23):1432–5.
13. Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res.* 1985 Jun 1;38(5):469–79.

14. Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4223–34.
15. Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*. 1996 May 15;87(10):4235–44.
16. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lämmle B. Deficient Activity of von Willebrand Factor–Cleaving Protease in Chronic Relapsing Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3097–103.
17. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1998 Nov 26;339(22):1585–94.
18. Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, et al. von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 1998 Nov 26;339(22):1578–84.
19. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lämmle B. Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1998 Apr 15;91(8):2839–46.
20. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001 Oct 4;413(6855):488–94.
21. Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med*. 1991 Aug 8;325(6):393–7.
22. Gerritsen HE, Robles R, Lämmle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1654–61.
23. Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1662–6.
24. Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T, et al. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J Biochem (Tokyo)*. 2001 Oct;130(4):475–80.
25. Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*. 2001 Nov 2;276(44):41059–63.
26. Tang BL, Hong W. ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats. *FEBS Lett*. 1999 Feb 26;445(2–3):223–5.

27. Tang BL. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Jan;33(1):33–44.
28. Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, López-Otín C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene.* 2002 Jan 23;283(1–2):49–62.
29. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* 2005 Feb 15;386(Pt 1):15–27.
30. Bork P, Beckmann G. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol.* 1993 May 20;231(2):539–45.
31. Blanc G, Font B, Eichenberger D, Moreau C, Ricard-Blum S, Hulmes DJS, et al. Insights into how CUB domains can exert specific functions while sharing a common fold: conserved and specific features of the CUB1 domain contribute to the molecular basis of procollagen C-proteinase enhancer-1 activity. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8;282(23):16924–33.
32. Majerus EM, Zheng X, Tuley EA, Sadler JE. Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *J Biol Chem.* 2003 Nov 21;278(47):46643–8.
33. Crawley JTB, de Groot R, Xiang Y, Luken BM, Lane DA. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood.* 2011 Sep 22;118(12):3212–21.
34. Ricketts LM, Dlugosz M, Luther KB, Haltiwanger RS, Majerus EM. O-fucosylation is required for ADAMTS13 secretion. *J Biol Chem.* 2007 Jun 8;282(23):17014–23.
35. Zhou W, Tsai H-M. N-Glycans of ADAMTS13 modulate its secretion and von Willebrand factor cleaving activity. *Blood.* 2009 Jan 22;113(4):929–35.
36. Hiura H, Matsui T, Matsumoto M, Hori Y, Isonishi A, Kato S, et al. Proteolytic fragmentation and sugar chains of plasma ADAMTS13 purified by a conformation-dependent monoclonal antibody. *J Biochem (Tokyo).* 2010 Oct;148(4):403–11.
37. Sorvillo N, Kaijen PH, Matsumoto M, Fujimura Y, van der Zwaan C, Verbij FC, et al. Identification of N-linked glycosylation and putative O-fucosylation, C-mannosylation sites in plasma derived ADAMTS13. *J Thromb Haemost JTH.* 2014 May;12(5):670–9.
38. Akiyama M, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Nov 17;106(46):19274–9.
39. Plaimauer B, Zimmermann K, Völkel D, Antoine G, Kerschbaumer R, Jenab P, et al. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3626–32.
40. Claus RA, Bockmeyer CL, Kentouche K, Sieber MW, Oberle V, Kaufmann R, et al. Transcriptional regulation of ADAMTS13. *Thromb Haemost.* 2005 Jul;94(1):41–5.

41. Zhou W, Inada M, Lee T-P, Benten D, Lyubsky S, Bouhassira EE, et al. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2005 Jun;85(6):780–8.
42. Shang D, Zheng XW, Niiya M, Zheng XL. Apical sorting of ADAMTS13 in vascular endothelial cells and Madin-Darby canine kidney cells depends on the CUB domains and their association with lipid rafts. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2207–15.
43. Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong J-F, Moake J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost JTH*. 2006 Jun;4(6):1396–404.
44. Turner NA, Nolasco L, Ruggeri ZM, Moake JL. Endothelial cell ADAMTS-13 and VWF: production, release, and VWF string cleavage. *Blood*. 2009 Dec 3;114(24):5102–11.
45. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, et al. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jan 2;313(1):212–6.
46. Liu L, Choi H, Bernardo A, Bergeron AL, Nolasco L, Ruan C, et al. Platelet-derived VWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13. *J Thromb Haemost JTH*. 2005 Nov;3(11):2536–44.
47. Furlan M, Robles R, Morselli B, Sandoz P, Lämmle B. Recovery and half-life of von Willebrand factor-cleaving protease after plasma therapy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*. 1999 Jan;81(1):8–13.
48. Plaimauer B, Kremer Hovinga JA, Juno C, Wolfsegger MJ, Skalicky S, Schmidt M, et al. Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies. *J Thromb Haemost JTH*. 2011 May;9(5):936–44.
49. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:395–424.
50. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, de Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost JTH*. 2004 Apr;2(4):561–73.
51. Veyradier A, Coppo P. [ADAMTS13, von Willebrand factor specific cleaving protease]. *Médecine Sci MS*. 2011 Dec;27(12):1097–105.
52. Santoro SA. Preferential binding of high molecular weight forms of von Willebrand factor to fibrillar collagen. *Biochim Biophys Acta*. 1983 Mar 15;756(1):123–6.
53. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LH, Hellums JD. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest*. 1986 Dec;78(6):1456–61.
54. Romijn RA, Bouma B, Wuyster W, Gros P, Kroon J, Sixma JJ, et al. Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):9985–91.

55. Romijn RA, Westein E, Bouma B, Schiphorst ME, Sixma JJ, Lenting PJ, et al. Mapping the collagen-binding site in the von Willebrand factor-A3 domain. *J Biol Chem*. 2003 Apr 25;278(17):15035–9.
56. Lisman T, Raynal N, Groeneveld D, Maddox B, Peachey AR, Huizinga EG, et al. A single high-affinity binding site for von Willebrand factor in collagen III, identified using synthetic triple-helical peptides. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3753–6.
57. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood*. 1996 Oct 15;88(8):2939–50.
58. Zhang X, Halvorsen K, Zhang C-Z, Wong WP, Springer TA. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*. 2009 Jun 5;324(5932):1330–4.
59. Zhang Q, Zhou Y-F, Zhang C-Z, Zhang X, Lu C, Springer TA. Structural specializations of A2, a force-sensing domain in the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 9;106(23):9226–31.
60. Nishio K, Anderson PJ, Zheng XL, Sadler JE. Binding of platelet glycoprotein Ibalpha to von Willebrand factor domain A1 stimulates the cleavage of the adjacent domain A2 by ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10578–83.
61. Miura S, Li CQ, Cao Z, Wang H, Wardell MR, Sadler JE. Interaction of von Willebrand factor domain A1 with platelet glycoprotein Ibalpha-(1-289). Slow intrinsic binding kinetics mediate rapid platelet adhesion. *J Biol Chem*. 2000 Mar 17;275(11):7539–46.
62. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz RR, et al. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 8;104(19):7899–903.
63. Dong J, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*. 2002 Dec 1;100(12):4033–9.
64. Chauhan AK, Motto DG, Lamb CB, Bergmeier W, Dockal M, Plaimauer B, et al. Systemic antithrombotic effects of ADAMTS13. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):767–76.
65. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol*. 2005 Apr;129(1):93–100.
66. Ai J, Smith P, Wang S, Zhang P, Zheng XL. The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2005 Aug 19;280(33):29428–34.
67. Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, Majerus EM, Sadler JE. Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost JTH*. 2009 Dec;7(12):2088–95.

68. Zhang P, Pan W, Rux AH, Sachais BS, Zheng XL. The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1887–94.
69. Banno F, Chauhan AK, Kokame K, Yang J, Miyata S, Wagner DD, et al. The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5323–9.
70. Niiya M, Endo M, Shang D, Zoltick PW, Muvarak NE, Cao W, et al. Correction of ADAMTS13 deficiency by in utero gene transfer of lentiviral vector encoding ADAMTS13 genes. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2009 Jan;17(1):34–41.
71. Shida Y, Nishio K, Sugimoto M, Mizuno T, Hamada M, Kato S, et al. Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1295–8.
72. Akiyama M, Nakayama D, Takeda S, Kokame K, Takagi J, Miyata T. Crystal structure and enzymatic activity of an ADAMTS-13 mutant with the East Asian-specific P475S polymorphism. *J Thromb Haemost JTH*. 2013 Jul;11(7):1399–406.
73. de Groot R, Lane DA, Crawley JTB. The role of the ADAMTS13 cysteine-rich domain in VWF binding and proteolysis. *Blood*. 2015 Mar 19;125(12):1968–75.
74. Zheng X, Nishio K, Majerus EM, Sadler JE. Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):30136–41.
75. Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood*. 2004 Jan 15;103(2):607–12.
76. Gao W, Anderson PJ, Majerus EM, Tuley EA, Sadler JE. Exosite interactions contribute to tension-induced cleavage of von Willebrand factor by the antithrombotic ADAMTS13 metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 12;103(50):19099–104.
77. Jin S-Y, Skipwith CG, Zheng XL. Amino acid residues Arg(659), Arg(660), and Tyr(661) in the spacer domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood*. 2010 Mar 18;115(11):2300–10.
78. Pos W, Crawley JTB, Fijnheer R, Voorberg J, Lane DA, Luken BM. An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood*. 2010 Feb 25;115(8):1640–9.
79. Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, Yagi H, Ishizashi H, Maeda H, et al. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood*. 2003 Nov 1;102(9):3232–7.
80. de Groot R, Bardhan A, Ramroop N, Lane DA, Crawley JTB. Essential role of the disintegrin-like domain in ADAMTS13 function. *Blood*. 2009 May 28;113(22):5609–16.

81. Xiao J, Jin S-Y, Xue J, Sorvillo N, Voorberg J, Zheng XL. Essential domains of a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats-13 metalloprotease required for modulation of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Oct;31(10):2261–9.
82. Tao Z, Peng Y, Nolasco L, Cal S, Lopez-Otin C, Li R, et al. Recombinant CUB-1 domain polypeptide inhibits the cleavage of ULVWF strings by ADAMTS13 under flow conditions. *Blood.* 2005 Dec 15;106(13):4139–45.
83. Zanardelli S, Chion ACK, Groot E, Lenting PJ, McKinnon TAJ, Laffan MA, et al. A novel binding site for ADAMTS13 constitutively exposed on the surface of globular VWF. *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2819–28.
84. Crawley JTB, de Groot R, Luken BM. Circulating ADAMTS-13-von Willebrand factor complexes: an enzyme on demand. *J Thromb Haemost JTH.* 2009 Dec;7(12):2085–7.
85. Wu T, Lin J, Cruz MA, Dong J, Zhu C. Force-induced cleavage of single VWFA1A2A3 tridomains by ADAMTS-13. *Blood.* 2010 Jan 14;115(2):370–8.
86. Wu J-J, Fujikawa K, McMullen BA, Chung DW. Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 5;103(49):18470–4.
87. de Groot R, Lane DA, Crawley JTB. The ADAMTS13 metalloprotease domain: roles of subsites in enzyme activity and specificity. *Blood.* 2010 Oct 21;116(16):3064–72.
88. Xiang Y, de Groot R, Crawley JTB, Lane DA. Mechanism of von Willebrand factor scissile bond cleavage by a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jul 12;108(28):11602–7.
89. South K, Luken BM, Crawley JTB, Phillips R, Thomas M, Collins RF, et al. Conformational activation of ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Dec 30;111(52):18578–83.
90. Muia J, Zhu J, Gupta G, Haberichter SL, Friedman KD, Feys HB, et al. Allosteric activation of ADAMTS13 by von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Dec 30;111(52):18584–9.
91. Crawley JTB, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):1085–93.
92. Studt J-D, Kremer Hovinga JA, Antoine G, Hermann M, Rieger M, Scheiflinger F, et al. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood.* 2005 Jan 15;105(2):542–4.
93. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong J. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood.* 2004 Jul 1;104(1):100–6.

94. Shelat SG, Ai J, Zheng XL. Molecular biology of ADAMTS13 and diagnostic utility of ADAMTS13 proteolytic activity and inhibitor assays. *Semin Thromb Hemost*. 2005 Dec;31(6):659–72.
95. Wang Y, Chen J, Ling M, López JA, Chung DW, Fu X. Hypochlorous acid generated by neutrophils inactivates ADAMTS13: an oxidative mechanism for regulating ADAMTS13 proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem*. 2015 Jan 16;290(3):1422–31.
96. Feys HB, Vandeputte N, Palla R, Peyvandi F, Peerlinck K, Deckmyn H, et al. Inactivation of ADAMTS13 by plasmin as a potential cause of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost JTH*. 2010 Sep;8(9):2053–62.
97. Dong J, Moake JL, Bernardo A, Fujikawa K, Ball C, Nolasco L, et al. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2003 Aug 8;278(32):29633–9.
98. Davis AK, Makar RS, Stowell CP, Kuter DJ, Dzik WH. ADAMTS13 binds to CD36: a potential mechanism for platelet and endothelial localization of ADAMTS13. *Transfusion (Paris)*. 2009 Feb;49(2):206–13.
99. Veyradier A, Lavergne J-M, Ribba A-S, Obert B, Loirat C, Meyer D, et al. Ten candidate ADAMTS13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *J Thromb Haemost JTH*. 2004 Mar;2(3):424–9.
100. Pérez-Rodríguez A, Lourés E, Rodríguez-Trillo Á, Costa-Pinto J, García-Rivero A, Batlle-López A, et al. Inherited ADAMTS13 deficiency (Upshaw-Schulman syndrome): a short review. *Thromb Res*. 2014 Dec;134(6):1171–5.
101. Kim H-Y, Lee K-O, Yoo KH, Kim S-H, Oh D, Kim H-J. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) caused by novel ADAMTS13 mutations. *Br J Haematol*. 2015 Jun 18;
102. Peyvandi F, Lavoretano S, Palla R, Valsecchi C, Merati G, De Cristofaro R, et al. Mechanisms of the interaction between two ADAMTS13 gene mutations leading to severe deficiency of enzymatic activity. *Hum Mutat*. 2006 Apr;27(4):330–6.
103. Pimanda JE, Maekawa A, Wind T, Paxton J, Chesterman CN, Hogg PJ. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in association with a mutation in the second CUB domain of ADAMTS13. *Blood*. 2004 Jan 15;103(2):627–9.
104. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, et al. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 3;99(18):11902–7.
105. Assink K, Schiphorst R, Allford S, Karpman D, Etzioni A, Brichard B, et al. Mutation analysis and clinical implications of von Willebrand factor-cleaving protease deficiency. *Kidney Int*. 2003 Jun;63(6):1995–9.

106. Hommais A, Rayes J, Houllier A, Obert B, Legendre P, Veyradier A, et al. Molecular characterization of four ADAMTS13 mutations responsible for congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *Thromb Haemost.* 2007 Sep;98(3):593–9.
107. Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Miura M, Hayashi S, Fujii Y, et al. Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood.* 2004 Feb 15;103(4):1305–10.
108. Upshaw JD. Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 1978 Jun 15;298(24):1350–2.
109. Schulman I, Pierce M, Lukens A, Currimbhoy Z. Studies on thrombopoiesis. I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood.* 1960 Jul;16:943–57.
110. Camilleri RS, Cohen H, Mackie IJ, Scully M, Starke RD, Crawley JTB, et al. Prevalence of the ADAMTS-13 missense mutation R1060W in late onset adult thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2008;6(2):331–338.
111. Tao Z, Anthony K, Peng Y, Choi H, Nolasco L, Rice L, et al. Novel ADAMTS-13 mutations in an adult with delayed onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost JTH.* 2006 Sep;4(9):1931–5.
112. Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, et al. Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2004 Oct 1;104(7):2081–3.
113. Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, et al. Novel compound heterozygote mutations (H234Q/R1206X) of the ADAMTS13 gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome showing predominant episodes of repeated acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 2006 May;21(5):1289–92.
114. Schneppenheim R, Budde U, Oyen F, Angerhaus D, Aumann V, Drewke E, et al. von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP. *Blood.* 2003 Mar 1;101(5):1845–50.
115. Loirat C, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura in children. *Curr Opin Pediatr.* 2013 Apr;25(2):216–24.
116. Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, Yagi H, Kokame K, Soejima K, et al. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost JTH.* 2011 Jul;9 Suppl 1:283–301.
117. Lotta LA, Wu HM, Mackie IJ, Noris M, Veyradier A, Scully MA, et al. Residual plasmatic activity of ADAMTS13 is correlated with phenotype severity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2012 Jul 12;120(2):440–8.

118. Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M, Boisseau P, Galicier L, Azoulay E, et al. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5888–97.
119. Loirat C, Girma J-P, Desconclois C, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura related to severe ADAMTS13 deficiency in children. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2009 Jan;24(1):19–29.
120. Antoine G, Zimmermann K, Plaimauer B, Grillowitz M, Studt J-D, Lämmle B, et al. ADAMTS13 gene defects in two brothers with constitutional thrombotic thrombocytopenic purpura and normalization of von Willebrand factor-cleaving protease activity by recombinant human ADAMTS13. *Br J Haematol*. 2003 Mar;120(5):821–4.
121. Kokame K. [Genetic polymorphism of von Willebrand factor (VWF)-cleaving protease, ADAMTS13]. *Brain Nerve Shinkei Kenkyū No Shinpo*. 2008 Nov;60(11):1325–32.
122. Tseng SC, Kimchi-Sarfaty C. SNPs in ADAMTS13. *Pharmacogenomics*. 2011 Aug;12(8):1147–60.
123. Ruan C, Dai L, Su J, Wang Z, Ruan C. The frequency of P475S polymorphism in von Willebrand factor-cleaving protease in the Chinese population and its relevance to arterial thrombotic disorders. *Thromb Haemost*. 2004 Jun;91(6):1257–8.
124. Bongers TN, De Maat MPM, Dippel DWJ, Uitterlinden AG, Leebeek FWG. Absence of Pro475Ser polymorphism in ADAMTS-13 in Caucasians. *J Thromb Haemost JTH*. 2005 Apr;3(4):805.
125. Schettert IT, Pereira AC, Lopes NH, Hueb WA, Krieger JE. Association between ADAMTS13 polymorphisms and risk of cardiovascular events in chronic coronary disease. *Thromb Res*. 2010 Jan;125(1):61–6.
126. Kokame K, Kokubo Y, Miyata T. Polymorphisms and mutations of ADAMTS13 in the Japanese population and estimation of the number of patients with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost JTH*. 2011 Aug;9(8):1654–6.
127. Kim B, Hing ZA, Wu A, Schiller T, Struble EB, Liuwantara D, et al. Single-nucleotide variations defining previously unreported ADAMTS13 haplotypes are associated with differential expression and activity of the VWF-cleaving protease in a Salvadoran congenital thrombotic thrombocytopenic purpura family. *Br J Haematol*. 2014 Apr;165(1):154–8.
128. Zhou W, Dong L, Ginsburg D, Bouhassira EE, Tsai H-M. Enzymatically active ADAMTS13 variants are not inhibited by anti-ADAMTS13 autoantibodies: a novel therapeutic strategy? *J Biol Chem*. 2005 Dec 2;280(48):39934–41.
129. Jian C, Xiao J, Gong L, Skipwith CG, Jin S-Y, Kwaan HC, et al. Gain-of-function ADAMTS13 variants that are resistant to autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2012 Apr 19;119(16):3836–43.

130. Sorvillo N, Pos W, van den Berg LM, Fijnheer R, Martinez-Pomares L, Geijtenbeek TB, et al. The macrophage mannose receptor promotes uptake of ADAMTS13 by dendritic cells. *Blood*. 2012 Apr 19;119(16):3828–35.
131. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol*. 2012 Dec;92(6):1177–86.
132. Banno F, Kaminaka K, Soejima K, Kokame K, Miyata T. Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30896–903.
133. Bruno K, Völkel D, Plaimauer B, Antoine G, Pable S, Motto DG, et al. Cloning, expression and functional characterization of the full-length murine ADAMTS13. *J Thromb Haemost JTH*. 2005 May;3(5):1064–73.
134. L. Gilardin, A. Stépanian, A. Veyradier, P. Coppo, pour le Centre de référence des microangiopathies thrombotiques (CNR-MAT). Purpura thrombotique thrombocytopénique : physiopathologie, clinique, pronostic et traitement. EMC - Hématologie. 2013;8(3):1–8.
135. Coppo P, Bengoufa D, Veyradier A, Wolf M, Bussel A, Millot GA, et al. Severe ADAMTS13 deficiency in adult idiopathic thrombotic microangiopathies defines a subset of patients characterized by various autoimmune manifestations, lower platelet count, and mild renal involvement. *Medicine (Baltimore)*. 2004 Jul;83(4):233–44.
136. Terrell DR, Motto DG, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, George JN, Vesely SK. Blood group O and black race are independent risk factors for thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe ADAMTS13 deficiency. *Transfusion (Paris)*. 2011 Oct;51(10):2237–43.
137. Coppo P, Schwarzsinger M, Buffet M, Wynckel A, Clabault K, Presne C, et al. Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience. *PloS One*. 2010;5(4):e10208.
138. Török TJ, Holman RC, Chorba TL. Increasing mortality from thrombotic thrombocytopenic purpura in the United States--analysis of national mortality data, 1968-1991. *Am J Hematol*. 1995 Oct;50(2):84–90.
139. Terrell DR, Williams LA, Vesely SK, Lämmle B, Hovinga JAK, George JN. The incidence of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: all patients, idiopathic patients, and patients with severe ADAMTS-13 deficiency. *J Thromb Haemost JTH*. 2005 Jul;3(7):1432–6.
140. Benhamou Y, Boelle P-Y, Baudin B, Ederhy S, Gras J, Galicier L, et al. Cardiac troponin-I on diagnosis predicts early death and refractoriness in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *J Thromb Haemost JTH*. 2015 Feb;13(2):293–302.
141. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med*. 2002 Aug 22;347(8):589–600.

142. Kizaki M, Ikeda Y. [Red cell fragmentation and hemolysis in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med*. 1993 Jan;51(1):117–21.
143. Widemann A, Pasero C, Arnaud L, Poullin P, Loundou AD, Choukroun G, et al. Circulating endothelial cells and progenitors as prognostic factors during autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura: results of a prospective multicenter French study. *J Thromb Haemost JTH*. 2014 Oct;12(10):1601–9.
144. Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, Homeister J, Lamb CB, Desch KC, et al. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2752–61.
145. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, et al. Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3161–6.
146. Schiviz A, Wuersch K, Piskernik C, Dietrich B, Hoellriegl W, Rottensteiner H, et al. A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood*. 2012 Jun 21;119(25):6128–35.
147. Pickens B, Mao Y, Li D, Siegel DL, Poncz M, Cines DB, et al. Platelet-delivered ADAMTS13 inhibits arterial thrombosis and prevents thrombotic thrombocytopenic purpura in murine models. *Blood*. 2015 May 21;125(21):3326–34.
148. Feys HB, Roodt J, Vandeputte N, Pareyn I, Lamprecht S, van Rensburg WJ, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (*Papio ursinus*). *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2005–10.
149. Laje P, Shang D, Cao W, Niiya M, Endo M, Radu A, et al. Correction of murine ADAMTS13 deficiency by hematopoietic progenitor cell-mediated gene therapy. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2172–80.
150. Trionfini P, Tomasoni S, Galbusera M, Motto D, Longaretti L, Corna D, et al. Adenoviral-mediated gene transfer restores plasma ADAMTS13 antigen and activity in ADAMTS13 knockout mice. *Gene Ther*. 2009 Nov;16(11):1373–9.
151. Veyradier A, Girma J-P. Assays of ADAMTS-13 activity. *Semin Hematol*. 2004 Jan;41(1):41–7.
152. Tripodi A, Chantarangkul V, Böhm M, Budde U, Dong J-F, Friedman KD, et al. Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13): results of an international collaborative study involving 11 methods testing the same set of coded plasmas. *J Thromb Haemost JTH*. 2004 Sep;2(9):1601–9.
153. Mahdian R, Rayes J, Girma J-P, Houllier A, Obert B, Meyer D, et al. Comparison of FRETs-VWF73 to full-length VWF as a substrate for ADAMTS13 activity measurement in human plasma samples. *Thromb Haemost*. 2006 Jun;95(6):1049–51.
154. Tripodi A, Peyvandi F, Chantarangkul V, Palla R, Afrasiabi A, Canciani MT, et al. Second international collaborative study evaluating performance characteristics of

- methods measuring the von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13). *J Thromb Haemost JTH*. 2008 Sep;6(9):1534–41.
155. Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, Mackie I, Scully MA, Machin SJ. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost JTH*. 2010 Apr;8(4):631–40.
  156. Starke R, Machin S, Scully M, Purdy G, Mackie I. The clinical utility of ADAMTS13 activity, antigen and autoantibody assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2007 Feb;136(4):649–55.
  157. Bell WR, Braine HG, Ness PM, Kickler TS. Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. Clinical experience in 108 patients. *N Engl J Med*. 1991 Aug 8;325(6):398–403.
  158. Kremer Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lämmle B, George JN. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2010 Feb 25;115(8):1500–11.
  159. Deford CC, Reese JA, Schwartz LH, Perdue JJ, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, et al. Multiple major morbidities and increased mortality during long-term follow-up after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2013 Sep 19;122(12):2023–9.
  160. Lim W, Vesely SK, George JN. The role of rituximab in the management of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2015 Mar 5;125(10):1526–31.
  161. Westwood J-P, Webster H, McGuckin S, McDonald V, Machin SJ, Scully M. Rituximab for thrombotic thrombocytopenic purpura: benefit of early administration during acute episodes and use of prophylaxis to prevent relapse. *J Thromb Haemost JTH*. 2013 Mar;11(3):481–90.
  162. Scully M, McDonald V, Cavenagh J, Hunt BJ, Longair I, Cohen H, et al. A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1746–53.
  163. Froissart A, Buffet M, Veyradier A, Poullin P, Provôt F, Malot S, et al. Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Crit Care Med*. 2012 Jan;40(1):104–11.
  164. de la Rubia J, Moscardó F, Gómez MJ, Guardia R, Rodríguez P, Sebrango A, et al. Efficacy and safety of rituximab in adult patients with idiopathic relapsing or refractory thrombotic thrombocytopenic purpura: results of a Spanish multicenter study. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. 2010 Dec;43(3):299–303.
  165. Scully M, Cohen H, Cavenagh J, Benjamin S, Starke R, Killick S, et al. Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13. *Br J Haematol*. 2007 Feb;136(3):451–61.

166. Goyal J, Adamski J, Lima JLO, Marques MB. Relapses of thrombotic thrombocytopenic purpura after treatment with rituximab. *J Clin Apheresis*. 2013 Dec;28(6):390–4.
167. Chemnitz JM, Uener J, Hallek M, Scheid C. Long-term follow-up of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura treated with rituximab. *Ann Hematol*. 2010 Oct;89(10):1029–33.
168. Hie M, Gay J, Galicier L, Provôt F, Presne C, Poullin P, et al. Preemptive rituximab infusions after remission efficiently prevent relapses in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2014 Jul 10;124(2):204–10.
169. Mariani M, Cairo A, Palla R, Lotta LA, Consonni D, Rovati A, et al. B and T lymphocytes in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during disease remission. *Thromb Res*. 2011 Dec;128(6):590–2.
170. Schaller M, Vogel M, Kentouche K, Lämmle B, Kremer Hovinga JA. The splenic autoimmune response to ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura contains recurrent antigen-binding CDR3 motifs. *Blood*. 2014 Nov 27;124(23):3469–79.
171. Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, Mudde G, Wolf M, Coppo P, et al. Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity. *Blood*. 2007 Apr 1;109(7):2815–22.
172. Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, Veyradier A, Kremer Hovinga JA, Scheiflinger F. IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost JTH*. 2009 Oct;7(10):1703–10.
173. Rieger M, Mannucci PM, Kremer Hovinga JA, Herzog A, Gerstenbauer G, Konetschny C, et al. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1262–7.
174. Ferrari S, Palavra K, Gruber B, Kremer Hovinga JA, Knöbl P, Caron C, et al. Persistence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2014 Apr;99(4):779–87.
175. Pos W, Luken BM, Sorvillo N, Hovinga J a. K, Voorberg J. Humoral immune response to ADAMTS13 in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2011 Jul 1;9(7):1285–91.
176. Pos W, Luken BM, Hovinga JAK, Turenhout EAM, Scheiflinger F, Dong J-F, et al. VH1-69 germline encoded antibodies directed towards ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost JTH*. 2009 Mar;7(3):421–8.

177. Pos W, Sorvillo N, Fijnheer R, Feys HB, Kaijen PHP, Vidarsson G, et al. Residues Arg568 and Phe592 contribute to an antigenic surface for anti-ADAMTS13 antibodies in the spacer domain. *Haematologica*. 2011 Nov;96(11):1670–7.
178. Luken BM, Turenhout EAM, Hulstein JJJ, Van Mourik JA, Fijnheer R, Voorberg J. The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*. 2005 Feb;93(2):267–74.
179. Luken BM, Turenhout EAM, Kaijen PHP, Greuter MJ, Pos W, van Mourik JA, et al. Amino acid regions 572-579 and 657-666 of the spacer domain of ADAMTS13 provide a common antigenic core required for binding of antibodies in patients with acquired TTP. *Thromb Haemost*. 2006 Sep;96(3):295–301.
180. Zheng XL, Wu HM, Shang D, Falls E, Skipwith CG, Cataland SR, et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2010 Sep;95(9):1555–62.
181. Klaus C, Plaimauer B, Studt J-D, Dorner F, Lämmle B, Mannucci PM, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4514–9.
182. Scheiflinger F, Knöbl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, et al. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2003 Nov 1;102(9):3241–3.
183. Shelat SG, Smith P, Ai J, Zheng XL. Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance in vivo. *J Thromb Haemost JTH*. 2006 Aug;4(8):1707–17.
184. Ferrari S, Knöbl P, Kolovratova V, Plaimauer B, Turecek PL, Varadi K, et al. Inverse correlation of free and immune complex-sequestered anti-ADAMTS13 antibodies in a patient with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost JTH*. 2012 Jan;10(1):156–8.
185. Thomas MR, de Groot R, Scully MA, Crawley JTB. Pathogenicity of Anti-ADAMTS13 Autoantibodies in Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *EBioMedicine*. 2015 Aug;2(8):942–52.
186. Peyvandi F, Lavoretano S, Palla R, Feys HB, Vanhoorelbeke K, Battaglioli T, et al. ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission. *Haematologica*. 2008 Feb;93(2):232–9.
187. Ridolfi RL, Bell WR. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1981 Nov;60(6):413–28.
188. Musio F, Bohen EM, Yuan CM, Welch PG. Review of thrombotic thrombocytopenic purpura in the setting of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 1998 Aug;28(1):1–19.

189. Brunner HI, Freedman M, Silverman ED. Close relationship between systemic lupus erythematosus and thrombotic thrombocytopenic purpura in childhood. *Arthritis Rheum.* 1999 Nov;42(11):2346–55.
190. Tandon NN, Rock G, Jamieson GA. Anti-CD36 antibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 1994 Dec;88(4):816–25.
191. Schultz DR, Arnold PI, Jy W, Valant PA, Gruber J, Ahn YS, et al. Anti-CD36 autoantibodies in thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic disorders: identification of an 85 kD form of CD36 as a target antigen. *Br J Haematol.* 1998 Dec;103(3):849–57.
192. Aiken ML, Ginsberg MH, Byers-Ward V, Plow EF. Effects of OKM5, a monoclonal antibody to glycoprotein IV, on platelet aggregation and thrombospondin surface expression. *Blood.* 1990 Dec 15;76(12):2501–9.
193. Park YA, Poisson JL, McBee MT, Afenyi-Annan A. Seasonal association of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion (Paris).* 2012 Jul;52(7):1530–4.
194. Franchini M. Thrombotic thrombocytopenic purpura: proposal of a new pathogenic mechanism involving *Helicobacter pylori* infection. *Med Hypotheses.* 2005;65(6):1128–31.
195. Yagita M, Uemura M, Nakamura T, Kunitomi A, Matsumoto M, Fujimura Y. Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Hepatol.* 2005 Mar;42(3):420–1.
196. Cserti CM, Landaw S, Uhl L. Do infections provoke exacerbations and relapses of thrombotic thrombocytopenic purpura? *J Clin Apheresis.* 2007 Feb;22(1):21–5.
197. Kiki I, Gundogdu M, Albayrak B, Bilgiç Y. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with *Brucella* infection. *Am J Med Sci.* 2008 Mar;335(3):230–2.
198. Kosugi N, Tsurutani Y, Isonishi A, Hori Y, Matsumoto M, Fujimura Y. Influenza A infection triggers thrombotic thrombocytopenic purpura by producing the anti-ADAMTS13 IgG inhibitor. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2010;49(7):689–93.
199. Talebi T, Fernandez-Castro G, Montero AJ, Stefanovic A, Lian E. A case of severe thrombotic thrombocytopenic purpura with concomitant *Legionella* pneumonia: review of pathogenesis and treatment. *Am J Ther.* 2011 Sep;18(5):e180-185.
200. Niv E, Segev A, Ellis MH. *Staphylococcus aureus* bacteremia as a cause of early relapse of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion (Paris).* 2000 Sep;40(9):1067–70.
201. Morgand M, Buffet M, Busson M, Loiseau P, Malot S, Amokrane K, et al. High prevalence of infectious events in thrombotic thrombocytopenic purpura and genetic relationship with toll-like receptor 9 polymorphisms: experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Transfusion (Paris).* 2014 Feb;54(2):389–97.

202. Douglas KW, Pollock KGJ, Young D, Catlow J, Green R. Infection frequently triggers thrombotic microangiopathy in patients with preexisting risk factors: a single-institution experience. *J Clin Apheresis*. 2010;25(2):47–53.
203. Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lämmle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood*. 2012 Aug 9;120(6):1157–64.
204. Laurence J, Mitra D, Steiner M, Staiano-Coico L, Jaffe E. Plasma from patients with idiopathic and human immunodeficiency virus-associated thrombotic thrombocytopenic purpura induces apoptosis in microvascular endothelial cells. *Blood*. 1996 Apr 15;87(8):3245–54.
205. Ruiz-Torres MP, Casiraghi F, Galbusera M, Macconi D, Gastoldi S, Todeschini M, et al. Complement activation: the missing link between ADAMTS-13 deficiency and microvascular thrombosis of thrombotic microangiopathies. *Thromb Haemost*. 2005 Mar;93(3):443–52.
206. Westwood J-P, Langley K, Heelas E, Machin SJ, Scully M. Complement and cytokine response in acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Br J Haematol*. 2014 Mar;164(6):858–66.
207. Réti M, Farkas P, Csuka D, Rázsó K, Schlammadinger Á, Udvardy ML, et al. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost JTH*. 2012 May;10(5):791–8.
208. Wu TC, Yang S, Haven S, Holers VM, Lundberg AS, Wu H, et al. Complement activation and mortality during an acute episode of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost JTH*. 2013 Oct;11(10):1925–7.
209. Verbij FC, Fijnheer R, Voorberg J, Sorvillo N. Acquired TTP: ADAMTS13 meets the immune system. *Blood Rev*. 2014 Nov;28(6):227–34.
210. Jones EY, Fugger L, Strominger JL, Siebold C. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol*. 2006 Apr;6(4):271–82.
211. Coppo P, Busson M, Veyradier A, Wynckel A, Poullin P, Azoulay E, et al. HLA-DRB1\*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J Thromb Haemost JTH*. 2010 Apr;8(4):856–9.
212. Scully M, Brown J, Patel R, McDonald V, Brown CJ, Machin S. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J Thromb Haemost JTH*. 2010 Feb;8(2):257–62.
213. John M-L, Hitzler W, Scharrer I. The role of human leukocyte antigens as predisposing and/or protective factors in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol*. 2012 Apr;91(4):507–10.
214. Joseph G, Smith KJ, Hadley TJ, Djulbegovic B, Troup GM, Oldfather J, et al. HLA-DR53 protects against thrombotic thrombocytopenic purpura/adult hemolytic uremic syndrome. *Am J Hematol*. 1994 Nov;47(3):189–93.

215. Studt J-D, Hovinga JAK, Radonic R, Gasparovic V, Ivanovic D, Merkler M, et al. Familial acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: ADAMTS13 inhibitory autoantibodies in identical twins. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4195–7.
216. Sorvillo N, van Haren SD, Kaijen PH, ten Brinke A, Fijnheer R, Meijer AB, et al. Preferential HLA-DRB1\*11-dependent presentation of CUB2-derived peptides by ADAMTS13-pulsed dendritic cells. *Blood*. 2013 Apr 25;121(17):3502–10.
217. Gilardin L, Delignat S, Peyron I, Ing M, Lone Y-C, Gangadharan B, et al. The ADAMTS131239-1253 peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4+ T-cell epitope. *Haematologica*. 2017 Nov;102(11):1833–41.
218. Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault M-C, Naselli G, Mittag D, Combadière B, et al. acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses. *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2128–37.
219. Zhang L, Udaka K, Mamitsuka H, Zhu S. Toward more accurate pan-specific MHC-peptide binding prediction: a review of current methods and tools. *Brief Bioinform*. 2012 May 1;13(3):350–64.
220. Janeway CA, Maurer PH, Dailey MO, Inman JK. The specificity of cellular immune responses II. The structure of antigenic determinants leading to T-lymphocyte stimulation. *J Exp Med*. 1976 Dec 1;144(6):1621–40.
221. Townsend A, Ohlén C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Kärre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*. 1989 Aug 10;340(6233):443–8.
222. Parham P. Antigen presentation. Peptide feeding and cellular cookery. *Nature*. 1990 Aug 30;346(6287):793–5.
223. Joyce S, Nathenson SG. Methods to study peptides associated with MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol*. 1994 Feb;6(1):24–31.
224. Schumacher TN, De Bruijn ML, Vernie LN, Kast WM, Melief CJ, Neefjes JJ, et al. Peptide selection by MHC class I molecules. *Nature*. 1991 Apr 25;350(6320):703–6.
225. Rudensky AY, null P, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*. 1991 Oct 17;353(6345):622–7.
226. Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen A, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol*. 1989 Dec;19(12):2237–42.
227. Pashov AD, Calvez T, Gilardin L, Maillère B, Repessé Y, Oldenburg J, et al. In silico calculated affinity of FVIII-derived peptides for HLA class II alleles predicts inhibitor development in haemophilia A patients with missense mutations in the F8 gene. *Haemoph Off J World Fed Hemoph*. 2014 Mar;20(2):176–84.

228. Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, Ponomarenko J, Clark JD, Cantrell JR, et al. The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D405-412.
229. Wang P, Sidney J, Dow C, Mothé B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol.* 2008 Apr;4(4):e1000048.
230. Pajot A, Michel M-L, Fazilleau N, Pancré V, Auriault C, Ojcius DM, et al. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol.* 2004 Nov;34(11):3060–9.
231. Steinitz KN, van Helden PM, Binder B, Wraith DC, Unterthurner S, Hermann C, et al. CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes associated with antibody responses after intravenously and subcutaneously applied human FVIII in humanized hemophilic E17 HLA-DRB1\*1501 mice. *Blood.* 2012 Apr 26;119(17):4073–82.
232. Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M, et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:568.
233. Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. Predictions versus high-throughput experiments in T-cell epitope discovery: competition or synergy? *Expert Rev Vaccines.* 2012 Jan;11(1):43–54.
234. González-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM, Kempson F, Maia MHT, da Silva ALS, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D784-788.
235. Texier C, Pouvelle S, Busson M, Hervé M, Charron D, Ménez A, et al. HLA-DR Restricted Peptide Candidates for Bee Venom Immunotherapy. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):3177–84.
236. Texier C, Pouvelle-Moratille S, Busson M, Charron D, Ménez A, Maillère B. Complementarity and redundancy of the binding specificity of HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 molecules. *Eur J Immunol.* 2001 Jun;31(6):1837–46.
237. Iliopoulou BP, Guerau-de-Arellano M, Huber BT. HLA-DR alleles determine responsiveness to *Borrelia burgdorferi* antigens in a mouse model of self-perpetuating arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Dec;60(12):3831–40.
238. Delignat S, Repessé Y, Gilardin L, Dimitrov JD, Lone YC, Kaveri SV, et al. Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemoph Off J World Fed Hemoph.* 2014 Jul;20(4):486–92.
239. Sanderson S, Shastri N. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int Immunol.* 1994 Mar;6(3):369–76.
240. Garnier A, Hamieh M, Drouet A, Leprince J, Vivien D, Frébourg T, et al. Artificial antigen-presenting cells expressing HLA class II molecules as an effective tool for amplifying human specific memory CD4(+) T cells. *Immunol Cell Biol.* 2016 Aug;94(7):662–72.

241. Verbij FC, Sorvillo N, Kaijen PHP, Hrdinova J, Peyron I, Fijnheer R, et al. The class I scavenger receptor CD163 promotes internalization of ADAMTS13 by macrophages. *Blood Adv.* 2017 Jan 24;1(5):293–305.
242. Rayes J, Ing M, Delignat S, Peyron I, Gilardin L, Vogel C-W, et al. Complement C3 is a novel modulator of the anti-factor VIII immune response. *Haematologica.* 2018 Feb;103(2):351–60.
243. Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Cilio CM, Wong FS, et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin Exp Immunol.* 2011 Jan;163(1):33–49.
244. Geiger R, Duhon T, Lanzavecchia A, Sallusto F. Human naive and memory CD4<sup>+</sup> T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J Exp Med.* 2009 Jul 6;206(7):1525–34.
245. Ayyoub M, Pignon P, Dojcinovic D, Raimbaud I, Old LJ, Luescher I, et al. Assessment of vaccine-induced CD4 T cell responses to the 119-143 immunodominant region of the tumor-specific antigen NY-ESO-1 using DRB1\*0101 tetramers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2010 Sep 15;16(18):4607–15.
246. Helms T, Boehm BO, Asaad RJ, Trezza RP, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Direct visualization of cytokine-producing recall antigen-specific CD4 memory T cells in healthy individuals and HIV patients. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2000 Apr 1;164(7):3723–32.
247. Lehmann PV. Image analysis and data management of ELISPOT assay results. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2005;302:117–32.
248. Martinuzzi E, Scotto M, Enée E, Brezar V, Ribeil J-A, van Endert P, et al. Serum-free culture medium and IL-7 costimulation increase the sensitivity of ELISpot detection. *J Immunol Methods.* 2008 Apr 20;333(1–2):61–70.
249. Janetzki S, Price L, Britten CM, van der Burg SH, Caterini J, Currier JR, et al. Performance of serum-supplemented and serum-free media in IFN $\gamma$  Elispot Assays for human T cells. *Cancer Immunol Immunother CII.* 2010 Apr;59(4):609–18.
250. Altman JD, Davis MM. MHC-peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells. *Curr Protoc Immunol Ed John E Coligan Al.* 2003 May;Chapter 17:Unit 17.3.
251. Purcell AW, van Driel IR, Gleeson PA. Impact of glycans on T-cell tolerance to glycosylated self-antigens. *Immunol Cell Biol.* 2008 Oct;86(7):574–9.
252. Verbij FC, Turksma AW, de Heij F, Kaijen P, Lardy N, Fijnheer R, et al. CD4<sup>+</sup> T cells from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura recognize CUB2 domain-derived peptides. *Blood.* 2016 Mar 24;127(12):1606–9.
253. Carson RT, Vignali KM, Woodland DL, Vignali DA. T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity.* 1997 Sep;7(3):387–99.

254. Holland CJ, Cole DK, Godkin A. Re-Directing CD4(+) T Cell Responses with the Flanking Residues of MHC Class II-Bound Peptides: The Core is Not Enough. *Front Immunol.* 2013;4:172.
255. Ooi JD, Holdsworth SR, Kitching AR. Advances in the pathogenesis of Goodpasture's disease: from epitopes to autoantibodies to effector T cells. *J Autoimmun.* 2008 Nov;31(3):295–300.
256. Hrdinová J, Verbij FC, Kaijen PHP, Hartholt RB, van Alphen F, Lardy N, et al. Mass spectrometry-assisted identification of ADAMTS13-derived peptides presented on HLA-DR and HLA-DQ. *Haematologica.* 2018;103(6):1083–92.
257. Roose E, Vidarsson G, Kangro K, Verhagen O, Mancini I, Desender L, et al. Anti-ADAMTS13 Autoantibodies against Cryptic Epitopes in Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Thromb Haemost.* 2018 Oct;118(10):1729–42.
258. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today.* 1993 Sep 1;14(9):426–30.
259. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Walker BD, Pereyra F, Cutrell E, et al. A method for identification of HIV gp140 binding memory B cells in human blood. *J Immunol Methods.* 2009 Apr 15;343(2):65–7.

## Liste des abréviations

**A13 : ADAMTS13:** A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 repeats, 13th member

**acDC :** coculture accélérée de cellules dendritiques (accelerated co-cultured DC)

**CPAA :** cellules présentatrices d'antigène artificielles

**ELISA :** technique de dosage enzymatique couplée à une immunoabsorption (Enzyme-Linked Immuno Assay)

**ELISPOT :** technique immunoenzymatique permettant de dénombrer des cellules à partir de leur sécrétion (enzyme-linked immunospot)

**FW :** Facteur Willebrand

**CI<sub>50</sub> :** concentration inhibitrice conduisant à un déplacement de 50% du peptide de référence

**CUB :** Complement C1r/C1s, sea Urchin epidermal growth factor, and Bone morphogenetic protein

**HLA :** Antigène leucocytaire humain (Human Leukocyte Antigen)

**IL<sub>2</sub> :** Interleukine 2

**IL<sub>4</sub> :** Interleukine 4

**MAI :** Maladies auto-immunes

**MAISA :** Maladies auto-immunes spécifiques d'antigène

**MMR :** récepteur macrophagique au mannose (Mannose Macrophage Receptor)

**MoDCs :** cellules dendritiques dérivées des monocytes (Monocytes derived Dendritic cells)

**NFAT:** facteur nucléaires des lymphocytes T activés (nuclear factor of activated T cells)

**PBMCs :** cellules mononucléées du sang circulant (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

**PTT :** Purpura Thrombotique Thrombocytopénique

**TcR :** récepteur des lymphocytes T (T-cell receptor)

**TSR :** domaine thrombospondine de type 1 répété

## Liste des Figures et Tableaux (Hors résultats des articles)

**Figure 1 :** Structure de la protéine ADAMTS13 et autres membres de la famille ADAMTS.

**Figure 2 :** Structure du Facteur Willebrand, déploiement et interactions avec ADAMTS13.

**Figure 3 :** Interactions entre ADAMTS13 et le domaine A2 du Facteur Willebrand.

**Figure 4 :** Représentation d'ADAMTS13 selon un modèle moléculaire montrant la protéine sous une forme repliée.

**Figure 5 :** Représentation schématique de l'action d'ADAMTS13 sur le Facteur Willebrand dans la circulation sanguine.

**Figure 6 :** Epitopes B d'ADAMTS13.

**Figure 7 :** Plusieurs peptides dérivés d'A13 sont des épitopes T pour des individus HLA-DRB1\*11.

**Figure 8 :** Reconnaissance de l'antigène par le TcR.

**Figure 9 :** Comparaison des poches des sillons des molécules HLA de classe I et de classe II assurant l'encrage des peptides antigéniques présentés aux lymphocytes.

**Figure 10 :** Epitopes T d'ADAMTS13.

**Tableau 1 :** Localisation des sites de glycosylations de la protéine ADAMTS13 avec le type de glycosylation retrouvé.

**Tableau 2 :** Degré d'homologie entre les domaines d'ADAMTS13 humaine et murine.

**Tableau 3 :** Résultats des études d'association entre PTT et HLA.

**Tableau 4 :** Peptides d'ADAMTS13 présentés par les molécules HLA-DR issues de MoDCs chargées avec différentes doses d'ADAMTS13, chez des donneurs sains d'HLA différents, d'après Sorvillo *et al.*.

**Tableau 5 :** Affinité des peptides dérivés d'ADAMTS13 pour les molécules HLA DRB1\*11:01.

**Tableau 6 :** Liste des Maladies auto-immunes spécifiques d'Antigène (MAISA) et cible antigénique reconnue par les anticorps.

## VI – ANNEXES

**Annexe 1 : L. Gilardin**, A. Stépanian, A. Veyradier, P. Coppo, pour le Centre de référence des microangiopathies thrombotiques (CNR-MAT). Purpura thrombotique thrombocytopénique : physiopathologie, clinique, pronostic et traitement. EMC - Hématologie. 2013;8(3):1–8.

**Annexe 2 : Gilardin L**, Delignat S, Peyron I, Ing M, Lone Y-C, Gangadharan B, *et al.* The ADAMTS131239-1253 peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitope. Haematologica. 2017 Nov;102(11):1833–41.

**Annexe 3 :** Pashov AD, Calvez T, **Gilardin L**, Maillère B, Repessé Y, Oldenburg J, *et al.* In silico calculated affinity of FVIII-derived peptides for HLA class II alleles predicts inhibitor development in haemophilia A patients with missense mutations in the F8 gene. Haemoph Off J World Fed Hemoph. 2014 Mar;20(2):176–84.

**Annexe 4 : Gilardin L**, Pashov A, Maillère B, Delignat S, Coppo P, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. In silico prediction of immuno-dominant T-cell epitopes on human therapeutic factor VIII. Réponse à Steinitz KN, van Helden PM, Binder B, Wraith DC, Unterthurner S, Hermann C, *et al.* CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes associated with antibody responses after intravenously and subcutaneously applied human FVIII in humanized hemophilic E17 HLA-DRB1\*1501 mice. Blood. 2012 Apr 26;119(17):4073–82.

**Annexe 5 :** Delignat S, Repessé Y, **Gilardin L**, Dimitrov JD, Lone YC, Kaveri SV, *et al.* Predictive immunogenicity of Refacto AF. Haemoph Off J World Fed Hemoph. 2014 Jul;20(4):486–92.

**Annexe 6 :** Rayes J, Ing M, Delignat S, Peyron I, **Gilardin L**, Vogel C-W, *et al.* Complement C3 is a novel modulator of the anti-factor VIII immune response. Haematologica. 2018 Feb;103(2):351–60.

**Annexe 7 :** Roose E, Vidarsson G, Kangro K, Verhagen O, Mancini I, Desender L, Pareyn I, Vandeputte N, Vandenbulcke A, Vendramin C, Schelpe AS, Voorberg J, Azerad MA, **Gilardin L**, *et al.* Anti-ADAMTS13 Autoantibodies against Cryptic Epitopes in Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. Thromb Haemost. 2018 Oct;118(10):1729–42.

# Purpura thrombotique thrombocytopénique : physiopathologie, clinique, pronostic et traitement

L. Gilardin, A. Stépanian, A. Veyradier, P. Coppo

Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une forme particulière de microangiopathie thrombotique (MAT) caractérisée dans sa forme typique par l'association de cinq manifestations : une atteinte neurologique, une fièvre, une insuffisance rénale, une anémie hémolytique mécanique et une thrombopénie de consommation. Ce tableau clinique est variable, puisqu'il peut être d'emblée sévère, avec de multiples défaillances d'organe engageant le pronostic vital, ou au contraire se résumer à une bicytopenie. Dans tous les cas, le PTT doit être rapidement diagnostiqué afin d'organiser une prise en charge spécialisée en urgence. Le PTT est une maladie rare, qui résulte au plan physiopathologique d'un déficit sévère en a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats, treizième membre (ADAMTS13), qui est l'enzyme intervenant dans la régulation de la taille des multimères plasmatiques de facteur de von Willebrand. Ce déficit peut être constitutionnel (en rapport avec des mutations des deux allèles du gène d'ADAMTS13) ou acquis (lié à des anticorps anti-ADAMTS13). Les progrès majeurs réalisés ces dernières années dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des MAT permettent de distinguer le PTT des autres situations au cours desquelles un syndrome de MAT peut être observé, comme en particulier le syndrome hémolytique et urémique, mais également le syndrome hémolytique, elevated liver enzymes, low platelet count (HELLP syndrome), les cancers et les chimiothérapies, les greffes de cellules souches hématopoïétiques, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. Le PTT est une maladie grave, mais son pronostic peut être excellent, à la condition d'assurer une prise en charge rapide et adaptée. Le traitement en urgence consiste à réaliser des échanges plasmatiques quotidiens jusqu'à disparition des souffrances d'organe et normalisation durable des plaquettes. Des traitements immunomodulateurs, comme en particulier le rituximab, y sont associés de manière croissante. Une protéine ADAMTS13 recombinante devrait bénéficier d'une évaluation dans le cadre d'essais thérapeutiques.

© 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots-clés :** Purpura thrombotique thrombocytopénique ; Microangiopathie thrombotique ; ADAMTS13 ; Rituximab ; Plasma

## Plan

|                                                                                                            |   |                                                                                        |   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------|---|
| ■ Introduction                                                                                             | 2 | ■ Examens complémentaires                                                              | 4 |
| ■ Physiopathologie                                                                                         | 2 | Biologie de routine                                                                    | 4 |
| ■ Clinique                                                                                                 | 2 | Mesure de l'activité ADAMTS13                                                          | 4 |
| Purpura thrombotique thrombocytopénique acquis                                                             | 2 | Histologie                                                                             | 4 |
| Purpura thrombotique thrombocytopénique héréditaire                                                        | 3 | ■ Traitement de première intention                                                     | 4 |
| Purpura thrombotique thrombocytopénique et grossesse                                                       | 3 | Plasmathérapie                                                                         | 4 |
| Purpura thrombotique thrombocytopénique chez le sujet infecté par le virus de l'immunodéficience humaine   | 3 | Traitements associés                                                                   | 6 |
| Purpura thrombotique thrombocytopénique associés aux thiénoxydines (ticlopidine, clopidogrel et prasugrel) | 4 | Traitement symptomatique                                                               | 6 |
|                                                                                                            |   | Purpura thrombotique thrombocytopénique en réponse non optimale au traitement standard | 6 |
|                                                                                                            |   | Rechutes                                                                               | 6 |
|                                                                                                            |   | ■ Pronostic                                                                            | 6 |
|                                                                                                            |   | ■ Conclusion                                                                           | 7 |

## ■ Introduction

Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une forme particulière de microangiopathie thrombotique (MAT) caractérisée par une anémie hémolytique mécanique (associée à la présence de schizocytes), une thrombopénie profonde, et une souffrance d'un ou plusieurs organes (cerveau et cœur en particulier), en rapport avec la formation de thrombi dans les vaisseaux de la microcirculation. Le PTT est une maladie rare, qui résulte au plan physiopathologique d'un déficit sévère en *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats*, treizième membre (ADAMTS13), qui est l'enzyme intervenant dans la régulation de la taille des multimères plasmatiques de facteur de Willebrand (FW). Ce déficit peut être constitutionnel (en rapport avec des mutations des deux allèles du gène d'ADAMTS13) ou acquis (lié à des anticorps anti-ADAMTS13). Les progrès majeurs réalisés dans la compréhension de la physiopathologie du PTT permettent maintenant de mieux comprendre l'efficacité de certains traitements utilisés jusqu'alors de manière empirique. Ils permettent également d'envisager prochainement des stratégies thérapeutiques ciblées. Le PTT est une maladie grave, mais son pronostic peut être excellent à la condition d'assurer une prise en charge rapide et adaptée. Il est donc important que les praticiens pouvant être confrontés à cette pathologie (hématologues, réanimateurs, urgentistes et internistes en particuliers) soient sensibilisés à ce diagnostic, malgré sa rareté, et connaissent le traitement de première intention. Une meilleure connaissance de cette pathologie représente ainsi un enjeu important pour en améliorer encore le pronostic.

## ■ Physiopathologie

Le FW est une glycoprotéine multimérique indispensable à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium et à leur aggrégation après survenue d'une brèche vasculaire. Ces propriétés sont exacerbées dans la microcirculation sanguine car les taux de cisaillement élevés du flux sanguin présents dans cette partie de l'arbre vasculaire rendent le FW plus affiné pour les plaquettes que le fibrinogène. Les multimères les plus grands du FW dits « méga-multimères » (leur poids moléculaire pouvant dépasser 20 000 kDa) sont ceux qui ont la plus forte capacité adhésive au sous-endothélium et aux plaquettes. Physiologiquement, la taille des multimères de FW et leurs capacités adhésives sont régulées par la métalloprotéase *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats* treizième membre (ADAMTS13), qui est une protéine ayant pour fonction spécifique de cliver les méga-multimères de FW en multimères de bas poids moléculaire. Le gène d'ADAMTS13 est situé sur le chromosome 9 et le lieu de synthèse principal de la protéine correspondante est le foie (cellules stellaires, dites cellules d'Ito). Les souris chez lesquelles le gène d'ADAMTS13 a été inactivé ne développent un syndrome de MAT que dans un fond génétique de prédisposition. Cependant, un tableau de MAT est plus fréquemment obtenu après injection à ces souris d'une toxine capable d'activer l'endothélium (shigatoxine), ce qui souligne l'importance probable des facteurs environnementaux, mais aussi l'importance de l'activation endothéliale en tant que facteur déclenchant (on parle de second *hit*). Ces résultats suggèrent également l'existence de gènes de susceptibilité autres qu'ADAMTS13, impliqués dans la survenue du PTT<sup>[1]</sup>. Cette activation de l'endothélium pourrait être non spécifique, secondaire à une infection mineure qui précède souvent la survenue du PTT<sup>[2]</sup>. Une variation saisonnière dans la survenue du PTT a ainsi été observée avec, dans une série d'une centaine de cas, davantage de cas survenus pendant l'été, suggérant l'influence d'un facteur environnemental<sup>[3]</sup>. Récemment, il a été montré que les taux plasmatiques de myéloperoxydase libérée par les polynucléaires neutrophiles activés, par exemple lors d'un épisode infectieux, étaient augmentés à la phase initiale du PTT et corrélés avec l'évolution du taux de plaquettes sous traitement<sup>[4]</sup>. D'autres auteurs ont évoqué le rôle possible du complément<sup>[5]</sup>.

Par ailleurs, un modèle de PTT acquis a été développé chez le primate non humain. Dans ce travail, des anticorps monoclonaux anti-ADAMTS13 développés chez la souris et reconnaissant le domaine catalytique ont été injectés à des babouins. Une thrombopénie a été observée rapidement au cours des 24 heures, suivie d'une anémie hémolytique à 72 heures. Des microthrombi ont été observés au sein de la plupart des organes de manière identique à ce qui a été rapporté chez l'homme. À l'inverse du modèle murin, le modèle de PTT chez le primate non humain suggère qu'un PTT pourrait survenir sans qu'il y ait nécessité constante d'un facteur déclenchant<sup>[6]</sup>. Cependant, ce modèle ne reproduit pas les formes sévères de PTT observées chez l'homme, ce qui pourrait s'expliquer par l'absence d'un second événement comme une stimulation endothéliale.



Si l'importance des facteurs environnementaux reste encore à déterminer avec précision, ces résultats confirment clairement le rôle majeur du déficit en ADAMTS13 dans la physiopathologie du PTT. En l'absence d'ADAMTS13, les multimères hyperadhésifs libérés par l'endothélium s'accumulent, et sont à l'origine de la formation de microthrombi au sein des capillaires et des artérioles de la microcirculation. Ces microthrombi sont responsables d'une ischémie et d'une souffrance viscérale disséminée, à l'origine du tableau de PTT.

Le déficit sévère en ADAMTS13 est expliqué par deux mécanismes : l'un héréditaire (< 5 % des cas) lié à des mutations du gène d'ADAMTS13 et qui se superpose globalement aux rares formes pédiatriques, l'autre acquis (> 95 % des cas) lié à des autoanticorps dirigés contre ADAMTS13 et qui correspond aux formes de l'adulte. Les anticorps anti-ADAMTS13 peuvent avoir un effet inhibiteur *in vitro* vis-à-vis d'ADAMTS13 dans 50 à 80 % des cas<sup>[7,8]</sup>. Ils sont le plus souvent d'isotype immunoglobuline G (IgG). Ces anticorps surviennent de manière transitoire et disparaissent durablement, ou peuvent persister en rémission et inhiber alors ADAMTS13 de manière durable, ce qui expose le patient à un risque de rechute d'environ 40 % au cours de la première année<sup>[9]</sup>.

Le déficit sévère en ADAMTS13 apparaît comme étant spécifique du PTT, puisque l'activité d'ADAMTS13 a été retrouvée sensiblement normale dans la majorité des cas de syndrome hémolytique et urémique (SHU), mais aussi au cours des autres syndromes de MAT, comme le syndrome *hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count* (HELLP), le syndrome catastrophique des antiphospholipides et les MAT en contexte d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Le sepsis sévère représente cependant une situation particulière, puisque dans ce contexte un déficit profond (< 10 % de l'activité) a pu être parfois retrouvé, probablement en rapport avec une consommation de la protéine ou un clivage par des enzymes protéolytiques<sup>[10]</sup>.

Les mécanismes à l'origine de la synthèse d'anticorps anti-ADAMTS13 de type IgG, et en particulier les mécanismes de la rupture de la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la protéine ADAMTS13, restent encore mal compris. Cependant, le PTT acquis a été associé à certains loci du système *human leucocyte antigen* (HLA) comme en particulier le locus portant les allèles DRB1\*11 et DQB1\*03. À l'inverse, d'autres loci comme le DRB1\*04 semblent être protecteurs vis-à-vis de la maladie<sup>[11-13]</sup>.

## ■ Clinique

### Purpura thrombotique thrombocytopénique acquis

Chez l'adulte, le PTT survient préférentiellement chez la femme (trois femmes pour deux hommes), au cours de la quatrième décennie. Les sujets noirs et les sujets d'Afrique du Nord semblent davantage exposés<sup>[14,15]</sup>. L'incidence du PTT est évaluée à quatre cas par million d'habitant et par an. Le début de la maladie est brutal. Une phase prodromique associant asthénie, arthralgies, myalgies, douleurs abdominales et lombaires, pouvant évoquer un processus infectieux, précède souvent de quelques jours la survenue du PTT.

Dans sa forme typique, le PTT associe cinq signes cardinaux : fièvre, insuffisance rénale, atteinte cérébrale, anémie hémolytique mécanique et thrombopénie périphérique. Un PTT doit cependant être systématiquement évoqué devant une bicytopenie (anémie et thrombopénie) associée à une défaillance d'organe, ou devant une bicytopenie sans défaillance d'organe apparente mais pour laquelle l'anémie hémolytique est mécanique (associée à des schizocytes).

La fièvre est présente dans 59 à 98 % des cas. Une atteinte cérébrale s'observe dans 84 à 92 % des cas. Celle-ci est caractérisée par son apparition brutale et sa fugacité, puisqu'elle peut atteindre différents territoires de manière intermittente, à quelques heures d'intervalle. Elle peut se manifester par un tableau de confusion avec obnubilation, des céphalées et des troubles de la conscience pouvant aller jusqu'au coma. Un déficit sensitif ou moteur systématisé, une dysarthrie ou une aphasie peuvent être observés. Les réflexes ostéotendineux sont souvent vifs. Vingt pour cent des patients peuvent présenter une crise convulsive, voire un état de mal épileptique. L'imagerie par résonance magnétique nucléaire peut retrouver des images évocatrices d'ischémie. Les séquences *fluid-attenuated inversion-recovery* sont particulièrement adaptées pour rechercher ce type de lésion. Une insuffisance rénale, en règle modérée, est retrouvée dans près de la moitié des cas. L'atteinte rénale peut se résumer à une protéinurie dont le débit est généralement inférieur à 3 g/24 h ou à une hématurie<sup>[15,16]</sup>.

Les autres manifestations témoignent du caractère disséminé du PTT. L'atteinte digestive se caractérise par des douleurs abdominales avec vomissements. Une atteinte cardiaque peut se manifester par des douleurs thoraciques et des troubles de la repolarisation sur l'électrocardiogramme. Une élévation de la troponine plasmatique a été associée à un risque de dysfonction ventriculaire séquentielle et de mortalité accrue. Plus rarement, une atteinte pulmonaire avec défaillance respiratoire et des atteintes oculaires ont été décrites. Parfois, il peut ne pas y avoir de défaillance d'organe évidente. Le PTT est alors purement hémato-logique et se révèle par un syndrome hémorragique avec purpura, ecchymoses, hématomes, ou encore par une asthénie d'apparition récente, dans le cadre du syndrome anémique.

L'association d'un PTT à un lupus érythémateux systémique a été largement rapportée, mais reste rare (<4 % des PTT)<sup>[15,17,18]</sup>. Cette association semble en revanche plus fréquente chez l'enfant (jusqu'à 26 % des PTT)<sup>[19]</sup>. De nombreuses autres maladies auto-immunes ont également été associées à un PTT acquis, dans près de 20 % des cas<sup>[15,16]</sup>. Différents autoanticorps peuvent être observés dans le PTT acquis, comme en particulier des anticorps antinucléaires, qui peuvent être retrouvés chez 40 à 50 % des patients<sup>[15]</sup>.

## Purpura thrombotique thrombocytopénique héréditaire

Dans le PTT héréditaire (anciennement désigné sous le terme de syndrome d'Upshaw-Schulman), près de 100 mutations génétiques ont été jusqu'alors rapportées. Les patients sont double-hétérozygotes, et la maladie se transmet sur un mode autosomique récessif<sup>[8,20]</sup>. La première poussée de la maladie a lieu en général avant l'âge de 10 ans, et dans plus de 50 % des cas dès la naissance. L'atteinte rénale est d'intensité variable (protéinurie, hématurie, insuffisance rénale de sévérité variable). Chez le nouveau-né, l'hémolyse et la thrombopénie inexplicables motivent parfois une exsanguino-transfusion. Au début, les poussées sont totalement régressives mais après quelques années d'évolution peuvent apparaître en l'absence de plasmathérapie prophylactique une insuffisance rénale chronique (pouvant faire porter à tort le diagnostic de SHU) et d'autres défaillances viscérales chroniques, en particulier cérébrales, liées aux épisodes ischémiques répétés. Souvent, l'atteinte hémato-logique est également chronique, et associe une hémolyse et une thrombopénie modérées. Dans certains cas, le diagnostic peut être retardé et une attention particulière doit être portée pour les MAT avec activité ADAMTS13 effondrée survenant dans le contexte de la grossesse, qui se révèlent être des PTT congénitaux dans près de 25 % des cas<sup>[21]</sup> (cf. infra).

## Purpura thrombotique thrombocytopénique et grossesse

Le PTT peut compliquer 1/25 000 à 1/198 000 grossesses, selon les définitions retenues dans les revues<sup>[21]</sup>. De même, les PTT associés à la grossesse représentent entre 10 et 30 % des PTT observés chez les adultes, selon la distinction ou non des femmes en âge de procréer au sein des patientes dans les registres. Quoi qu'il en soit, le PTT associé à la grossesse est très souvent la première manifestation de la pathologie. Cette forte association entre le PTT et la grossesse peut être expliquée par l'âge et la prédominance féminine générale dans le PTT, et le déséquilibre progressif durant la grossesse entre les taux de FW qui augmentent et ceux d'ADAMTS13 qui diminuent<sup>[22]</sup>. Cette dernière donnée est corroborée par le fait que le PTT survient surtout aux derniers trimestres, ou parfois en post-partum, mais très rarement au premier trimestre.

L'analyse de la cohorte française a montré qu'un premier épisode de PTT dans un contexte obstétrical est dû à une forme congénitale dans 24 % des cas, alors que ce chiffre est inférieur à 5 % dans le PTT chez les adultes en général<sup>[21]</sup>. L'analyse de la littérature met en évidence quelques différences entre le PTT congénital et le PTT acquis dans un contexte obstétrical. Dans le premier cas, la première grossesse est le plus souvent associée à un épisode de PTT, qui survient au troisième trimestre dans 75 % des cas ; la plasmathérapie est associée à un bon pronostic maternel, mais le pronostic foetal est systématiquement mauvais. Chez les patientes atteintes de PTT acquis dans un contexte obstétrical, la maladie survient à l'occasion de la première grossesse dans 82 % des cas, après la 20<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée dans 70 % des cas ; la plasmathérapie est également associée à un bon pronostic maternel ; le pronostic foetal est bon dans deux tiers des cas et corrélié au terme plus tardif de la grossesse. Le taux de survie globale chez les patientes est de 80 %, il est de 60 % chez les foetus.

Le diagnostic de PTT durant une grossesse est souvent difficile, car il survient chez des patientes sans antécédents la plupart du temps, et il n'est associé à aucun signe clinique ou biologique spécifique hormis un déficit sévère en ADAMTS13. En l'absence de traitement, le mauvais pronostic justifie qu'une patiente enceinte présentant une thrombopénie associée ou non à une anémie hémolytique, sans autre étiologie évoquée, soit à considérer comme atteinte de PTT jusqu'à preuve du contraire.

Le traitement du PTT dans un contexte obstétrical repose sur la plasmathérapie, comme chez les femmes non enceintes. En revanche, contrairement à la prééclampsie ou au syndrome HELLP, la délivrance n'est recommandée que chez les patientes qui ne répondent pas à ce traitement. L'utilisation du rituximab est actuellement discutée.

Il est essentiel d'inclure une étude complète d'ADAMTS13 dans le suivi des patientes en rémission après un PTT obstétrical, afin de distinguer les cas congénitaux des formes acquises de PTT. En effet, ces deux entités présentent un risque de récurrence et une prise en charge différents durant une prochaine grossesse. Dans les cas de PTT congénital, le risque de récurrence étant de 100 %, une prophylaxie précoce est essentielle puisqu'elle améliore les pronostics maternel et foetal. Dans les formes acquises, le risque de récurrence à la prochaine grossesse est de 20 % et la prise en charge prophylactique n'est pas consensuelle.

## Purpura thrombotique thrombocytopénique chez le sujet infecté par le virus de l'immunodéficience humaine

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) représente un facteur de risque de survenue de MAT en général. Les MAT survenant au cours de l'infection par le VIH regroupent deux grandes entités bien distinctes aux plans physiopathologique, sémiologique, thérapeutique et pronostique. Le PTT associé au VIH est caractérisé par son apparition brutale chez un patient ayant un déficit immunitaire modéré, avec peu d'antécédents de pathologies opportunistes, et un déficit sévère acquis en ADAMTS13. Les patients atteints d'un PTT associé à une infection par le VIH ont une présentation clinique proche

de celle des patients ayant un PTT idiopathique. En particulier, la fréquence de l'atteinte cérébrale, la profondeur des cytopénies et la faible fréquence de l'insuffisance rénale sont comparables entre ces deux populations<sup>[23]</sup>. Comme pour le PTT idiopathique, certaines ethnies sont plus à risque de développer un PTT en contexte d'infection par le VIH<sup>[24]</sup> sans que l'on sache clairement si cela est en rapport avec une incidence accrue de l'infection par le VIH dans ces populations ou avec l'existence de gènes de susceptibilité. Le diagnostic de PTT chez un patient infecté par le VIH implique la mise en place d'un traitement bien codifié en urgence associant échanges plasmatiques quotidiens, immunomodulateurs et traitement antirétroviral. Son pronostic est comparable à celui du PTT idiopathique. Le PTT associé au VIH se distingue des autres MAT du patient infecté par le VIH ; ces dernières se caractérisent par une installation plus insidieuse, elles surviennent chez des patients profondément immunodéprimés aux multiples antécédents de pathologies opportunistes, s'associent à une activité d'ADAMTS13 détectable, et sont de moins bon pronostic.

### Purpura thrombotique thrombocytopénique associés aux thiénoptyridines (ticlopidine, clopidogrel et prasugrel)

Des tableaux de MAT ont été décrits en association avec les trois molécules. En 2011, la Food and Drug Administration a comptabilisé 97 cas de MAT associées à la ticlopidine, 197 associées au clopidogrel et 14 associées au prasugrel. D'authentiques PTT, associés à un déficit sévère en ADAMTS13 lié à des anticorps anti-ADAMTS13, ont été décrits chez des patients traités par ticlopidine, typiquement 3 à 14 jours après la prise du médicament. Les anticorps inhibent ADAMTS13 indépendamment du médicament, ce qui suggère que ce sont des autoanticorps et non des anticorps immunoallergiques. Une étude a par ailleurs rapporté l'effet cytotoxique de la ticlopidine ou de ses métabolites sur l'endothélium, qui aboutit à un processus d'apoptose. Le pronostic est en règle bon sous échanges plasmatiques, avec un taux de réponse aux échanges plasmatiques de plus de 80 %, et les rechutes sont rares. Les MAT associées au clopidogrel ont davantage un profil de SHU puisque l'activité ADAMTS13 est détectable et l'insuffisance rénale est sévère. Ce tableau s'installe dans les 3 mois qui suivent le début du traitement, et parfois dans les premiers jours, ce qui suggère une toxicité directe du clopidogrel sur l'endothélium plutôt qu'un mécanisme immunologique. La réponse aux échanges plasmatiques est moins bonne et les rechutes plus fréquentes. Les mécanismes du syndrome de MAT associé à la prise de prasugrel restent encore à préciser<sup>[25]</sup>.

## ■ Examens complémentaires

### Biologie de routine

L'anémie est profonde et régénérative (taux de réticulocytes  $\geq 120 \times 10^9/l$ ). Le frottis sanguin met en évidence des schizocytes, traduisant le caractère mécanique de l'hémolyse. La recherche de schizocytes doit être répétée, ceux-ci pouvant apparaître de manière retardée par rapport aux cytopénies. Le test de Coombs est négatif. L'hémolyse est caractérisée par des taux sériques de bilirubine libre et de lactate déshydrogénase (LDH) élevés (l'élévation du taux de LDH est également liée à la souffrance viscérale), et par un taux d'haptoglobine sérique bas ou indosable. La thrombopénie est constante et souvent inférieure à  $30 \times 10^9/l$ . L'hémostase est normale, hormis des D-dimères discrètement élevés. Une polynucléose neutrophile est fréquente (en général  $< 20 \times 10^9/l$ ).

Les anticorps antinucléaires témoignent indirectement du caractère auto-immun de la maladie et ne semblent pas avoir de valeur pronostique particulière<sup>[15]</sup>.

### Mesure de l'activité ADAMTS13

L'exploration d'ADAMTS13 repose sur des tests qui restent du domaine de la recherche clinique et dont l'expertise nationale

est limitée aux laboratoires référents. L'absence de test d'urgence automatisé permettant de mesurer l'activité d'ADAMTS13 place ce paramètre au niveau d'une documentation rétrospective du diagnostic clinique d'une poussée de PTT. Par conséquent, l'attente du résultat de l'activité d'ADAMTS13 ne doit pas retarder le traitement.

L'étude de l'activité d'ADAMTS13 doit être systématiquement réalisée dans tout syndrome de MAT chez l'enfant, afin de ne pas méconnaître un PTT héréditaire, dont la réponse à la plasmathérapie est excellente. Par ailleurs, il faut savoir évoquer le diagnostic de PTT chez des enfants ayant apparemment un tableau de purpura thrombotique idiopathique ou de syndrome d'Evans ne répondant pas aux thérapeutiques classiques. En effet, certains de ces enfants peuvent avoir un authentique PTT, et la mise en évidence d'une activité d'ADAMTS13 indétectable permet alors de redresser le diagnostic.

Chez l'adulte, les indications sont les suivantes<sup>[8]</sup> (Fig. 1) :

- au diagnostic, devant un syndrome de MAT, en l'absence d'étiologie associée évidente (cancer évolutif, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques). En cas de déficit sévère en ADAMTS13, la négativité de la recherche des IgG anti-ADAMTS13 et de l'activité inhibitrice circulante peut suggérer le diagnostic de PTT héréditaire. L'exploration génétique d'ADAMTS13 est réalisée si l'activité d'ADAMTS13 (en l'absence d'autoanticorps anti-ADAMTS13 détectables) reste inférieure à 10 % en rémission ;
- après obtention de la rémission. L'ascension de l'activité d'ADAMTS13 à un taux supérieur à 10 % témoigne d'un déficit acquis. L'étude d'ADAMTS13 permet d'évaluer le risque de rechute, qui est de l'ordre de 50 % au cours de la première année en cas de déficit persistant<sup>[9]</sup>.

### Histologie

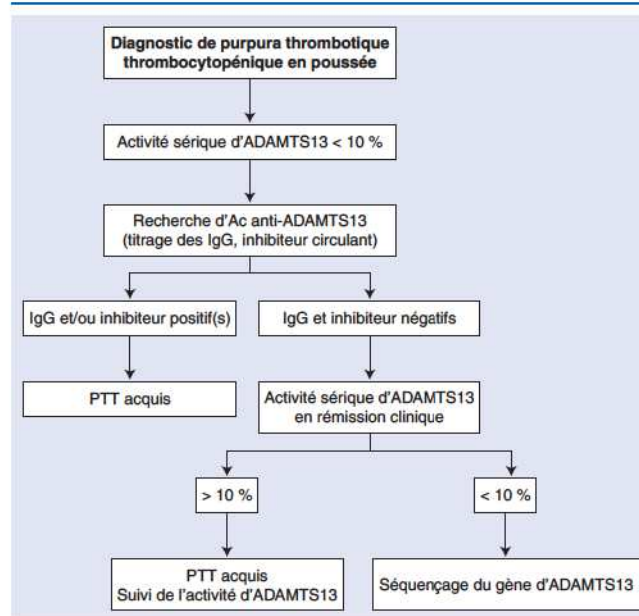
Au plan histopathologique, le PTT est caractérisé par l'occlusion des capillaires et des artérioles terminales par des thrombi plaquettaires associés à un matériel hyalin en endothélial et sous-endothélial. Il n'y a ni nécrose, ni lésions de vascularite, ni infiltrat inflammatoire périvasculaire. Ces lésions peuvent être mises en évidence dans la plupart des organes : cerveau, rein, peau, cœur, poumons, œil, tube digestif, pancréas et surrénales. Les lésions endothéliales observées ne sont pas spécifiques du PTT, puisqu'elles s'observent aussi au cours des autres MAT. Les lésions observées au cours du PTT sont par contre caractérisées par la présence de thrombi plaquettaires riches en FW, alors que dans le SHU ces thrombi sont plutôt riches en fibrine, ce qui (entre autres) permet de distinguer ces deux entités. En pratique cependant, la documentation histopathologique n'est plus nécessaire pour porter le diagnostic de PTT.

## ■ Traitement de première intention

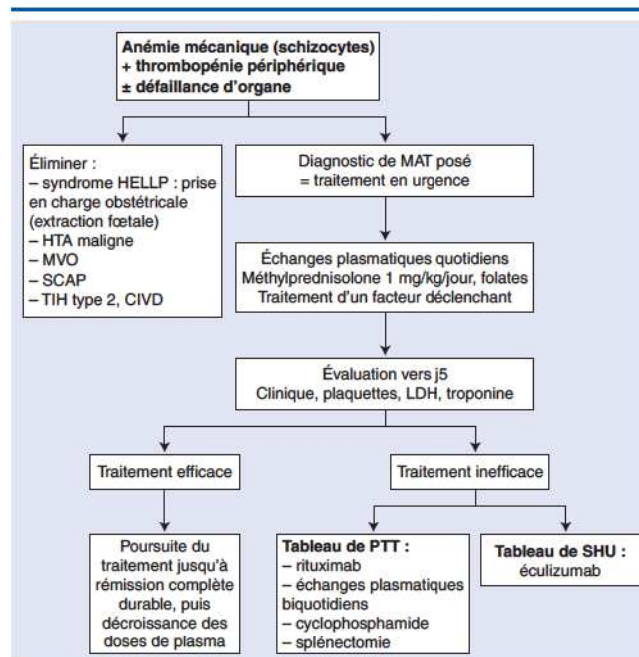
Le traitement du PTT est toujours une urgence (Fig. 2). La fréquence des souffrances viscérales à la phase aiguë et l'évolution potentiellement grave de celles-ci doivent faire préférer une hospitalisation en unité de soins intensifs jusqu'à ce que le taux de plaquettes soit supérieur à  $50 \times 10^9/l$ .

### Plasmathérapie

Chez l'adulte, le traitement repose actuellement sur la réalisation d'échanges plasmatiques, qui permettent l'apport de volumes importants de plasma (et donc d'ADAMTS13). Si ceux-ci ne peuvent être réalisés en urgence, des perfusions de grands volumes de plasma ( $30 \text{ ml/kg/j}$ ) peuvent être instituées. Les perfusions de plasma à de telles posologies sont cependant responsables de surcharges hydrosodées, de protéinuries de surcharge ou d'hyperprotidémies potentiellement responsables d'un syndrome d'hyperviscosité. Les échanges plasmatiques pourraient stabiliser la concentration d'anticorps anti-ADAMTS13, et ainsi empêcher



**Figure 1.** Arbre décisionnel. Exploration biologique d'un déficit sévère en *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 repeats*, treizième membre (ADAMTS13). PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique; Ac : anticorps; Ig : immunoglobulines.



**Figure 2.** Arbre décisionnel. Attitude thérapeutique dans le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). HELLP : hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count; HTA : hypertension artérielle; MVO : maladies veino-occlusives; SCAP : syndrome catastrophique des antiphospholipides; TIH : thrombopénie induite par l'héparine; CVID : coagulation intravasculaire disséminée; MAT : microangiopathie thrombotique; LDH : lactodéshydrogénase; SHU : syndrome hémolytique et urémique.

l'augmentation de ceux-ci chez certains patients, et ainsi empêcher l'augmentation de celui-ci. Dans tous les cas, le traitement est à poursuivre jusqu'à la normalisation stable du chiffre de plaquettes ( $> 150 \times 10^9/l$  pendant au moins 48 heures). Les taux de réticulocytes et de LDH doivent être en cours de décroissance. La durée du traitement peut être très variable. Plusieurs dizaines d'échanges plasmatiques peuvent parfois être nécessaires.

L'utilisation croissante de rituximab (cf. infra) tend cependant à réduire la durée du traitement (qui dépasse désormais rarement 30 jours) et possiblement la fréquence des complications liées aux échanges plasmatiques. La décroissance du rythme des échanges plasmatiques doit être progressive. Une reprise évolutive doit motiver à nouveau la réalisation d'échanges plasmatiques quotidiens.

Chez l'enfant, la seule option thérapeutique efficace de manière curative, mais aussi préventive, sur les poussées de PTT est la plasmathérapie, dont la fréquence est guidée par la tolérance du fond chronique de la maladie.

### Traitements associés

Les corticoïdes à fortes doses ont été rapportés comme efficaces dans 56 % des PTT purement hématologiques. Il n'existe cependant pas d'étude randomisée permettant de démontrer clairement leur efficacité. Malgré un niveau de preuve faible, ils sont habituellement associés aux échanges plasmatiques en l'absence d'une contre-indication évidente comme un sepsis.

Les antiagrégants plaquettaires augmentent le risque de saignement et ne sont en général pas utilisés à la phase aiguë. De plus, le mécanisme par lequel ils inhibent l'agrégation plaquettaire diffère de celui par lequel les multimères de FW induisent une hyperagrégabilité plaquettaire dans cette maladie (interaction entre la glycoprotéine Ib plaquettaire et le FW).

Les autres traitements comme les perfusions d'héparine, de fibrinolytiques, de prostacycline ou de vitamine E sont inutiles et, pour certains, dangereux. Certaines études ont rapporté l'efficacité de l'immunoabsorption sur colonnes contenant la protéine A staphylococcique, en particulier chez des patients atteints de PTT dans un contexte de cancer [26, 27]. L'efficacité de ces colonnes chez les patients ayant un inhibiteur plasmatique de la protéase n'a pas été évaluée à ce jour.

### Traitement symptomatique

Une supplémentation par folates est nécessaire chez ces patients qui ont une régénération médullaire importante. Des transfusions de concentrés érythrocytaires sont réalisées afin de maintenir un taux d'hémoglobine supérieur ou égal à 8 g/dl. En l'absence de saignement grave, les transfusions de plaquettaires sont contre-indiquées car elles risqueraient d'entretenir et même de majorer la formation de microthrombi. Le traitement d'un éventuel facteur déclenchant ou d'une pathologie associée est indispensable (comme par exemple une infection par le VIH).

Le pronostic du PTT étant difficile à établir, des mesures de réanimation doivent être systématiquement proposées en cas de besoin. Ainsi, des séances d'épuration extrarénale sont réalisées dans les situations où l'atteinte rénale est sévère. Une défaillance respiratoire doit motiver un transfert précoce en réanimation afin de mettre en route une ventilation si possible non invasive afin d'éviter une intubation, particulièrement dangereuse dans ce contexte (risque hémorragique et infectieux).

### Purpura thrombotique thrombocytopénique en réponse non optimale au traitement standard

Le traitement standard permet d'obtenir une guérison dans environ 80 % des cas. Dans environ 10 % des cas cependant, les patients sont réfractaires au traitement standard (absence de doublement du chiffre de plaquettes après cinq jours de traitement bien mené). De plus, 50 % peuvent répondre initialement mais présenter dans un second temps une exacerbation de la maladie, nécessitant de poursuivre de manière parfois prolongée des échanges plasmatiques. Chez ces patients qui présentent des critères de réponse non optimale au traitement standard, un traitement par rituximab est classiquement réalisé, ce qui permet de raccourcir le délai de traitement chez les répondeurs les plus lents. En revanche, l'efficacité du rituximab n'est pas immédiate et nécessite un délai en moyenne de deux semaines. En cas d'aggravation malgré des injections de rituximab, des échanges plasmatiques biquotidiens, des bolus de cyclophosphamide, une splénectomie ou des injections hebdomadaires de vincristine (1,5 à 2 mg/semaine, pendant 3 à 4 semaines) peuvent être proposés. Le rituximab prévient efficacement les rechutes durant

l'année suivant son administration [28]. En revanche, des rechutes peuvent s'observer au-delà de cette période et sont contemporaines de la reconstitution immunitaire B [28, 29]. Des molécules en cours de développement devraient prochainement être évaluées dans le cadre d'essais thérapeutiques (protéine ADAMTS13 recombinante, N-acétylcystéine, inhibiteurs de la voie glycoprotéine Ib-FW) [30, 31]. En particulier, la protéine ADAMTS13 recombinante actuellement en cours de développement semble capable d'outrepasser, au moins in vitro, les capacités inhibitrices des anticorps [32] et est efficace dans un modèle murin de PTT congénital [33].

### Rechutes

Une rechute peut survenir dans 20 à 30 % des cas. À la phase aiguë, ces patients peuvent être traités selon les mêmes modalités qu'au diagnostic, et le rituximab est associé dans un nombre croissant de cas. Chez les patients présentant des rechutes à répétition, une splénectomie peut également être proposée en rémission. Chez les patients adultes conservant un déficit sévère en ADAMTS13 en rémission, des perfusions de rituximab peuvent se discuter, compte tenu du risque de rechute important.

### “ Points essentiels

- Le diagnostic de PTT repose sur l'association d'une anémie hémolytique mécanique (se traduisant par la présence de schizocytes), d'une thrombopénie périphérique généralement inférieure à 30 G/l et d'un déficit sévère (< 10 %) en ADAMTS13, la protéine clivant les multimères de FW de haut poids moléculaire. Ce diagnostic ne requiert plus la présence d'une souffrance d'organes, qui représente un critère de gravité plus qu'un critère diagnostique.
- Le traitement d'un purpura thrombotique thrombocytopénique repose sur la réalisation en urgence d'échanges plasmatiques quotidiens qui sont poursuivis jusqu'à obtention d'une rémission complète et durable. Le traitement d'une pathologie associée comme une infection par le VIH permet souvent d'accroître la réponse au traitement par plasma.
- La qualité de la réponse au traitement standard doit être évaluée après quelques jours. En cas de réponse suboptimale aux échanges plasmatiques, des perfusions de rituximab permettent de raccourcir la durée du traitement par échanges plasmatiques en induisant une déplétion en lymphocytes B, ce qui inhibe la synthèse d'anticorps anti-ADAMTS13.
- Le PTT est une pathologie grave, mais diagnostiquée à temps et traitée de manière adéquate son pronostic peut être excellent. Savoir reconnaître rapidement cette maladie rare et la prendre en charge en collaboration avec des équipes référentes est donc un enjeu important pour améliorer la survie des malades.

### ■ Pronostic

Le pronostic d'un PTT au diagnostic reste difficile à établir. Une étude a tenté d'établir un score pronostique de survie à partir de la sévérité de l'atteinte neurologique et de la biologie standard lors du diagnostic [34]. La valeur pronostique de ce score n'a cependant pas été totalement confirmée par d'autres équipes [35, 36]. Une autre étude a rapporté la valeur pronostique de la cinétique de correction des taux de plaquettes et de LDH en début de traitement [37]. L'âge semble être un facteur pronostique important,

puisque le taux de décès chez les patients de plus de 60 ans est de 23 à 43 %, contre 4 à 17 % chez les patients âgés de moins de 60 ans [38]. Ces études pourraient déboucher sur des schémas d'intensification thérapeutique dès le diagnostic pour les patients les plus à risque [36].

Le niveau d'activité d'ADAMTS13 s'associe à des caractéristiques cliniques et évolutives différentes [15, 39]. Ainsi, les patients ayant un déficit profond en ADAMTS13 présentent plus souvent des épisodes d'exacerbation de la maladie au cours du traitement, mais évoluent très rarement vers une insuffisance rénale sévère. À l'inverse, les patients ayant une activité ADAMTS13 détectable ont plus rarement des épisodes d'exacerbation du syndrome de MAT mais une insuffisance rénale terminale survient dans environ 20 % des cas. Les patients conservant une activité d'ADAMTS13 indétectable en rémission ont un risque de rechute de 40 % au cours de la première année (contre moins de 5 % en cas de normalisation de l'activité ADAMTS13), ce qui incite à évaluer l'activité d'ADAMTS13 une fois la guérison obtenue. Les anticorps anti-ADAMTS13 inhibiteurs au diagnostic sont de moins bon pronostic, avec des épisodes d'aggravation sous traitement ou lors de la décroissance des doses de plasma plus fréquents qu'avec les anticorps anti-ADAMTS13 non inhibiteurs [14, 40]. De même, la classe (IgA et IgG) d'Ig anti-ADAMTS13 et certaines sous-classes d'IgG (IgG1 et IgG3) semblent associées à des PTT de sévérité accrue [41].

## Conclusion

La structuration de la recherche clinique sur les microangiopathies thrombotiques à l'échelon national a permis d'accroître considérablement l'expérience que l'on a de ces pathologies. Au plan clinique, une meilleure connaissance sémiologique a permis d'identifier des facteurs prédictifs d'un déficit sévère en ADAMTS13 au diagnostic, ainsi que des facteurs pronostiques précoces associés au décès, permettant l'introduction plus rapide de thérapeutiques ciblées. Au plan physiopathologique, les premiers gènes de susceptibilité impliqués dans la survenue d'anticorps anti-ADAMTS13 ont été identifiés. Ces découvertes se traduisent actuellement par une utilisation croissante des immunomodulateurs comme le rituximab, ainsi que le recours à une stratégie d'escalade thérapeutique plus rapide chez les patients les plus graves. Dans un futur proche, les premiers essais thérapeutiques chercheront à évaluer l'intérêt d'une protéine ADAMTS13 recombinante, laissant envisager encore de nouveaux schémas de traitement.



## Références

- [1] Motto DG, Chauhan AK, Zhu G. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest* 2005;115:2752–61.
- [2] Douglas KW, Pollock KG, Young D, Catlow J, Green R. Infection frequently triggers thrombotic microangiopathy in patients with preexisting risk factors: a single-institution experience. *J Clin Apheresis* 2010;25:47–53.
- [3] Park YA, Poisson JL, McBee MT, Afenyi-Annan A. Seasonal association of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion* 2012;52:1530–4.
- [4] Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lammle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood* 2012;120:1157–64.
- [5] Reti M, Farkas P, Csuka D. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2012;10:791–8.
- [6] Feys HB, Roodt J, Vandepitte N. Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (*Papio ursinus*). *Blood* 2010;116:2005–10.
- [7] Coppo P, Veyradier A. Thrombotic microangiopathies: towards a pathophysiology-based classification. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009;9:36–50.
- [8] Veyradier A, Coppo P. ADAMTS13, von Willebrand factor specific cleaving protease. *Med Sci* 2012;27:1097–105.

- [9] Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M. Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity. *Blood* 2007;109:2815–22.
- [10] Crawley JT, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood* 2005;105:1085–93.
- [11] Coppo P, Busson M, Veyradier A. HLA-DRB1\*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J Thromb Haemost* 2010;8:856–9.
- [12] Scully M, Brown J, Patel R, McDonald V, Brown CJ, Machin S. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J Thromb Haemost* 2010;8:257–62.
- [13] John ML, Hitzler W, Scharrer I. The role of human leukocyte antigens as predisposing and/or protective factors in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol* 2012;91:507–10.
- [14] Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lammle B, George JN. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2010;115:1500–11 [quiz 662].
- [15] Coppo P, Schwarzwinger M, Buffet M. Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience. *Plos One* 2010;5:e10208.
- [16] Ridolfi RL, Bell WR. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Report of 25 cases and review of the literature. *Medicine* 1981;60:413–28.
- [17] Musio F, Bohen EM, Yuan CM, Welch PG. Review of thrombotic thrombocytopenic purpura in the setting of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1998;28:1–19.
- [18] Veyradier A, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP. Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood* 2001;98:1765–72.
- [19] Brunner HI, Freedman M, Silverman ED. Close relationship between systemic lupus erythematosus and thrombotic thrombocytopenic purpura in childhood. *Arthritis Rheum* 1999;42:2346–55.
- [20] Loirat C, Girma JP, Desconclois C, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura related to severe ADAMTS13 deficiency in children. *Pediatr Nephrol* 2009;24:19–29.
- [21] Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2012;119:5888–97.
- [22] Sanchez-Luceros A, Farias CE, Amaral MM, von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost* 2004;92:1320–6.
- [23] Malak S, Wolf M, Millot GA. Human immunodeficiency virus-associated thrombotic microangiopathies: clinical characteristics and outcome according to ADAMTS13 activity. *Scand J Immunol* 2008;68:337–44.
- [24] Hart D, Sayer R, Miller R. Human immunodeficiency virus associated thrombotic thrombocytopenic purpura—favourable outcome with plasma exchange and prompt initiation of highly active antiretroviral therapy. *Br J Haematol* 2011;153:515–9.
- [25] Jacob S, Dunn BL, Qureshi ZP. Ticlopidine-, clopidogrel-, and prasugrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura: a 20-year review from the southern network on adverse reactions (SONAR). *Semin Thromb Hemost* 2012;38:845–53.
- [26] Drew MJ. Resolution of refractory, classic thrombotic thrombocytopenic purpura after staphylococcal protein A immunoabsorption. *Transfusion* 1994;34:536–8.
- [27] Pineda AA, Vamvakas EC. Applications of therapeutic apheresis in patients with malignant disease. *Oncologist* 1997;2:94–103.
- [28] Froissart A, Buffet M, Veyradier A. Efficacy and safety of first-line rituximab in severe, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with a suboptimal response to plasma exchange. Experience of the French Thrombotic Microangiopathies Reference Center. *Crit Care Med* 2012;40:104–11.
- [29] Scully M, McDonald V, Cavenagh J. A phase II study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2011;118:1746–53.

- [30] Chen J, Rehman A, Gushiken FC. N-acetylcysteine reduces the size and activity of von Willebrand factor in human plasma and mice. *J Clin Invest* 2011;**121**:593–603.
- [31] Callewaert F, Roodt J, Ulrichs H. Evaluation of efficacy and safety of the anti-VWF Nanobody ALX-0681 in a preclinical baboon model of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2012;**120**:3603–10.
- [32] Plaimauer B, Kremer Hovinga JA, Juno C. Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies. *J Thromb Haemost* 2011;**9**:936–44.
- [33] Schiviz A, Wuersch K, Piskernik C. A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood* 2012;**119**:6128–35.
- [34] Rose M, Eldor A. High incidence of relapses in thrombotic thrombocytopenic purpura. Clinical study of 38 patients. *Am J Med* 1987;**83**:437–44.
- [35] Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Canadian Apheresis Study Group. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1991;**325**:393–7.
- [36] Wyllie BF, Garg AX, Macnab J, Rock GA, Clark WF. Thrombotic thrombocytopenic purpura/haemolytic uraemic syndrome: a new index predicting response to plasma exchange. *Br J Haematol* 2006;**132**:204–9.
- [37] Patton JF, Manning KR, Case D, Owen J. Serum lactate dehydrogenase and platelet count predict survival in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 1994;**47**:94–9.
- [38] Benhamou Y, Assie C, Boelle PY. Development and validation of a predictive model for death in acquired severe ADAMTS13 deficiency-associated idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: the French TMA Reference Center experience. *Haematologica* 2012;**97**:1181–6.
- [39] Bentley MJ, Lehman CM, Blaylock RC, Wilson AR, Rodgers GM. The utility of patient characteristics in predicting severe ADAMTS13 deficiency and response to plasma exchange. *Transfusion* 2011;**50**:1654–64.
- [40] Coppo P, Wolf M, Veyradier A. Prognostic value of inhibitory anti-ADAMTS13 antibodies in adult-acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2006;**132**:66–74.
- [41] Bettoni G, Palla R, Valsecchi C. ADAMTS-13 activity and autoantibodies classes and subclasses as prognostic predictors in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2012;**10**:1556–65.

### Pour en savoir plus

Site du CNR-MAT : [www.cnr-mat.fr](http://www.cnr-mat.fr).

L. Gilardin.

Centre de recherche des cordeliers, 15, rue de l'École de médecine, 75006 Paris, France.

A. Stépanian.

Service d'hématologie biologique, Hôpital Louis-Mourier, 178, rue des Renouillers, 92700 Colombes, France.

A. Veyradier.

Service d'hématologie biologique, Hôpital Antoine Bécère, AP-HP, 157, rue de la Porte de Trivaux, 92140 Clamart, France.

Université Paris-Sud 11, 63, rue Gabriel Péri, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

P. Coppo ([paul.coppo@sat.aphp.fr](mailto:paul.coppo@sat.aphp.fr)).

Centre de référence des microangiopathies thrombotiques, Service d'hématologie, Hôpital Saint-Antoine AP-HP, Université Pierre et Marie Curie, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012 Paris, France.

Unité Inserm 1009, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France.

Toute référence à cet article doit porter la mention : Gilardin L, Stépanian A, Veyradier A, Coppo P. Purpura thrombotique thrombocytopénique : physiopathologie, clinique, pronostic et traitement. *EMC - Hématologie* 2013;**8**(3):1-8 [Article 13-020-D-10].

Disponibles sur [www.em-consulte.com](http://www.em-consulte.com)



Arbres  
décisionnels



Iconographies  
supplémentaires



Vidéos/  
Animations



Documents  
légaux



Information  
au patient



Informations  
supplémentaires



Auto-  
évaluations



Cas  
clinique

# The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitope

Laurent Gilardin,<sup>1,2,3,4,#</sup> Sandrine Delignat,<sup>1,2,3</sup> Ivan Peyron,<sup>1,2,3</sup> Mathieu Ing,<sup>1,2,3</sup> Yu-Chun Lone,<sup>5</sup> Bagirath Gangadharan,<sup>1,2,3</sup> Baptiste Richard,<sup>1,2,3</sup> Yousra Kherabi,<sup>1,2,3</sup> Meenu Sharma,<sup>1,2,3</sup> Anastas Pashov,<sup>1,2,3,6</sup> Jean-Baptiste Latouche,<sup>7</sup> Mohamad Hamieh,<sup>7</sup> Olivier Toutirais,<sup>8</sup> Pascale Loiseau,<sup>9</sup> Lionel Galicier,<sup>10</sup> Agnès Veyradier,<sup>11</sup> Srinu Kaveri,<sup>1,2,3,12</sup> Bernard Maillère,<sup>13</sup> Paul Coppo<sup>4,14</sup> and Sébastien Lacroix-Desmazes<sup>1,2,3,12</sup>

\*Current affiliation: Service d'Onco-Hématologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, 75010 Paris, France

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche en Santé (UMR S) 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe Immunopathology and Therapeutic Immunointervention, Paris, France; <sup>2</sup>Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe Immunopathology and Therapeutic Immunointervention, Paris, France; <sup>3</sup>Université Paris Descartes – Paris 5, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Equipe Immunopathology and Therapeutic Immunointervention, Paris, France; <sup>4</sup>Centre National de Référence sur les Microangiopathies Thrombotiques, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Paris, France; <sup>5</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1014, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; <sup>6</sup>Department of Immunology, Institute of Microbiology, BAS, Sofia, Bulgaria; <sup>7</sup>Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU CH.NICOLLE, Rouen, France; <sup>8</sup>Laboratoire d'Immunologie and d'Immunopathologie, CHU Caen, France; <sup>9</sup>Laboratoire d'Immunologie et Histocompatibilité, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France; <sup>10</sup>Département d'Immunologie Clinique, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France; <sup>11</sup>Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Paris, France; <sup>12</sup>International Associated Laboratory IMPACT (INSERM, France-Indian Council of Medical Research, India), National Institute of Immunohaematology, Mumbai, India; <sup>13</sup>Institute of Biology and Technologies, SIMOPRO, Labex LERMIT, Labex VRI, Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA) Saclay, Gif sur Yvette, France and <sup>14</sup>Service d'Hématologie, Hôpital Saint Antoine, AP-HP, Paris, France



**Haematologica** 2017  
Volume 102(11):1833-1841

## ABSTRACT

Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura is a rare and severe disease characterized by auto-antibodies directed against “A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeats, 13<sup>th</sup> member” (ADAMTS13), a plasma protein involved in hemostasis. Involvement of CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of the disease is suggested by the IgG isotype of the antibodies. However, the nature of the CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes remains poorly characterized. Here, we determined the HLA-DR-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes of ADAMTS13. Candidate T-cell epitopes were predicted *in silico* and binding affinities were confirmed in competitive enzyme-linked immunosorbent assays. ADAMTS13-reactive CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas were generated following immunization of HLA-DR1 transgenic mice (Sure-L1 strain) and used to screen the candidate epitopes. We identified the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide as the single immunodominant HLA-DR1-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell epitope. This peptide is located in the CUB2 domain of ADAMTS13. It was processed by dendritic cells, stimulated CD4<sup>+</sup> T cells from Sure-L1 mice and was recognized by CD4<sup>+</sup> T cells from an HLA-DR1-positive patient with acute thrombotic thrombocytopenic purpura. Interestingly, the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide demonstrated promiscuity towards HLA-DR11 and HLA-DR15. Our work paves the way towards the characterization of the ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura using ADAMTS13<sup>1239-1253</sup>-loaded HLA-DR tetramers.

## Correspondence:

gilardin@gmail.com

Received: September 21, 2015.

Accepted: July 21, 2017.

Pre-published: July 27, 2017.

doi:10.3324/haematol.2015.136671

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: [www.haematologica.org/content/102/11/1833](http://www.haematologica.org/content/102/11/1833)

©2017 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>. Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



## Introduction

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a rare and severe autoimmune disease characterized by the occurrence of IgG autoantibodies against the metalloprotease "A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeats, 13<sup>th</sup> member" (ADAMTS13).<sup>1-3</sup> ADAMTS13 cleaves multimers of von Willebrand factor, a glycoprotein involved in hemostasis. Inhibition of ADAMTS13 by IgG leads to an accumulation of hyper-adhesive von Willebrand factor multimers causing microthrombi that occlude the lumen of the capillaries in the microcirculation, thus inducing red cell hemolysis and ischemia of downstream organs. TTP is thus characterized by a combination of microangiopathic hemolytic anemia, peripheral thrombocytopenia and organ failure of variable severity with typically neurological involvement.<sup>4</sup>

The physiopathological mechanisms underlying TTP and responsible for the synthesis of anti-ADAMTS13 antibodies, and particularly the mechanisms involved in the loss of tolerance of the immune system towards ADAMTS13, are poorly understood. Polyclonal anti-ADAMTS13 antibodies are directed against different domains of ADAMTS13.<sup>5</sup> In most patients, anti-ADAMTS13 antibodies are of the IgG isotype with a predominance of the IgG4 subclass.<sup>6</sup> IgG from all patients recognize immunodominant B-cell epitopes located in the spacer domain of ADAMTS13.<sup>7</sup> The B-cell epitopes have been proposed to be located between the 660-661 and 665 amino-acids.<sup>8</sup> The fact that anti-ADAMTS13 antibodies are of the IgG isotype, of high affinity and have undergone affinity maturation, strongly suggests the requirement of CD4<sup>+</sup> T-cell help in the development of the disease.<sup>9</sup> Besides, the HLA-DRB1\*11 (DR11) haplotype was independently identified as a strong risk factor by three research groups.<sup>10-12</sup> However, while CD4<sup>+</sup> T cells are

thought to play a major role, the specificity and the properties of the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes involved in the pathogenesis of TTP have not been studied. Importantly, the HLA restriction hints at the existence of immunodominant peptides in ADAMTS13.

Naïve CD4<sup>+</sup> T-cell activation is initiated by the interaction of the T-cell receptor (TCR) with a peptide/MHC class II complex on professional antigen-presenting cells. Extracellular antigens are endocytosed, degraded into peptides in the early endosome and loaded onto MHC class II  $\alpha\beta$  heterodimer molecules. Sorvillo *et al.* identified, through mass spectrometry, ADAMTS13-derived peptides that are localized within the HLA-DR molecules expressed by dendritic cells derived from human monocytes (Mo-DC) and incubated with ADAMTS13 *in vitro*.<sup>13</sup> The identified peptides belonged mainly to the CUB1 and CUB2 domains of ADAMTS13. The core sequence FINVAPHAR from the CUB2 domain was the only sequence detected for six donors with the DR11 haplotype among the 17 donors included in the study. In addition, the same group recently demonstrated that a peptide containing the FINVAPHAR amino-acid sequence is able to stimulate CD4<sup>+</sup> T cells from an HLA-DR11 TTP patient.<sup>14</sup> These studies did not, however, investigate the recognition of other peptides by CD4<sup>+</sup> T cells. To address this issue, we focused on the HLA-DR1 haplotype for which a humanized transgenic HLA-DR1 mouse is available, and investigated the CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes for the HLA-DR1 allele. The identified epitopes were then studied in the context of the HLA-DR11 allele.

## Methods

### Peptides and antigen

ADAMTS13-derived peptides were selected based on their

**Table 1.** Affinity of ADAMTS13-derived peptides for HLA-DRB1\*01:01 molecules.

|     | ADAMTS13 peptide | Domain          | Sequence <sup>a</sup>             | IC <sub>50</sub> (nM) <sup>b</sup> | Predicted binding score <sup>c</sup> |
|-----|------------------|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| 1   | 589-603          | Spacer          | RPL <b>F</b> THLAVRIGGRY          | 0.46                               | 7.01                                 |
| 2   | 267-281          | Metalloprotease | RRQLLSLLSAGRARC                   | 0.91                               | 1.36                                 |
| 3   | 371-385          | Disintegrin     | CRSL <b>V</b> ELTPIAAVHG          | 1.59                               | 4.22                                 |
| 4   | 1239-1253        | CUB1            | GDMLLLWGRLTWKRM                   | 1.61                               | 7.08                                 |
| 5   | 1392-1406        | CUB2            | EGFLKAQASLRGQYW                   | 3.74                               | 1.62                                 |
| 6   | 1355-1369        | CUB2            | ASYILIRDT <b>H</b> SLRTT          | 5.65                               | 6.65                                 |
| 7   | 774-788          | TSR 3           | GSL <b>L</b> KTLPPARCAG           | 7.11                               | 5.65                                 |
| 8   | 570-584          | Spacer          | YV <b>T</b> FLTVTPNLT <b>S</b> VY | 13.10                              | 0.79                                 |
| 9   | 914-928          | TSR 5           | ELRFLC <b>M</b> DSALRVPV          | 12.6                               | 3.24                                 |
| 10  | 1224-1238        | CUB1            | WTLRV <b>L</b> ESSLNCSA           | 13.68                              | 6.21                                 |
| 11  | 1281-1295        | CUB1            | GVLLRYGSQ <b>L</b> APETF          | 28.34                              | 6.90                                 |
| 12  | 464-478          | Cys-Rich        | GASFYHLGA <b>A</b> PHSQ           | 31.07                              | 8.42                                 |
| 13  | 1325-1339        | CUB2            | CRLFINVAPHAR <b>I</b> A           | 147.97                             | 1.99                                 |
| 14  | 140-154          | Metalloprotease | APNITANLTSSLLSV                   | 279.67                             | 9.74                                 |
| 15  | 308-322          | Disintegrin     | NEQCRVAFGPKAVAC                   | 5000                               | 8.11                                 |
| 16* | 111-125          | Metalloprotease | GAELLRDPS <b>L</b> GAQFR          | >10000                             | 20.93                                |

<sup>a</sup>ADAMTS13-derived peptides are sorted based on the measured IC<sub>50</sub> values compared to the HA<sup>206-318</sup> control peptide (IC<sub>50</sub>=4.61 nM). IC<sub>50</sub> values are shown in nM. A lower IC<sub>50</sub> value indicates stronger binding. IC<sub>50</sub>>10000 indicates no detectable binding in the assay. <sup>b</sup>Binding scores were generated by IEDB and reflect the expected binding affinities, with lower scores indicating stronger predicted affinities. <sup>c</sup>The nine-residue sequences (core peptides) predicted to fit into the HLA-DRB1\*01:01 binding groove are underlined for each peptide. Anchor residues are highlighted in bold. \*This ADAMTS13-derived peptide is used as a negative control, without detectable binding to HLA-DRB1\*01:01.

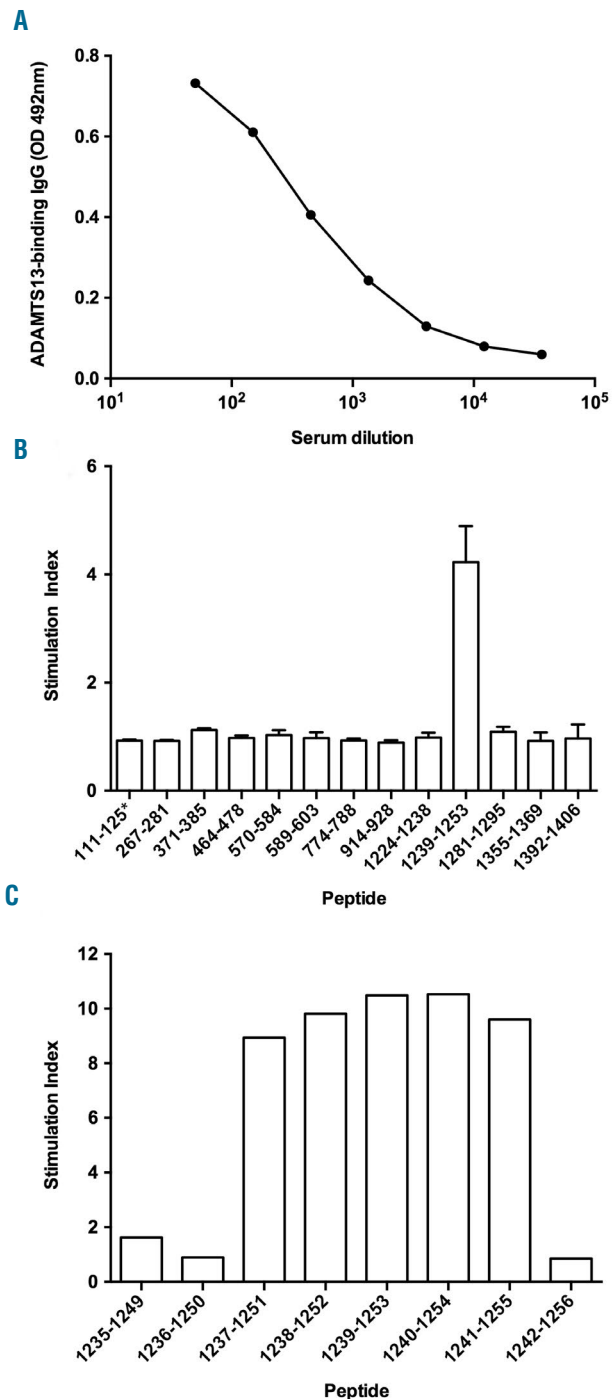
capacity to bind to HLA-DRB1\*01:01 molecules. HLA class II-binding predictions of human ADAMTS13 (GenBank reference: AAL11095.1) were made on November 10, 2011, using the Immune Epitope Database analysis resource consensus tool, on the dedicated website [www.iedb.org](http://www.iedb.org).<sup>15-17</sup> Strong HLA-DRB1\*01:01 binders were predicted *in silico* using overlapping 15-mer peptides that span the whole ADAMTS13 sequence. Altogether, 99 15-mer peptides were predicted to be strong binders to HLA-DRB1\*01:01 with binding scores below 10 (i.e., with a probability of being good binders greater than 90%). Some of the predicted peptides shared common HLA-DRB1\*01:01-binding core sequences (9-mer peptides). When considering only unique core sequences and after exclusion of two peptides located in the prodomain of ADAMTS13, the list came down to 15 9-mer core peptides (Table 1). The peptides were synthesized at greater than 80% purity (GL Biochem, Shanghai, China) and included the 9-mer core sequences with addition of the three residues from the N-terminal end and the three residues of the C-terminal end. Individual peptides were solubilized at 1 mg/mL in dimethylsulfoxide/water. Recombinant full-length human ADAMTS13 (rhADAMTS13) was a kind gift from Baxter (Vienna, Austria).<sup>18</sup>

### HLA-peptide-binding assays

HLA-DR molecules were purified from homozygous Epstein-Barr virus cell lines by affinity-chromatography using the monomorphic monoclonal antibody L243. The binding to HLA-DR molecules was assessed by competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using an automated workstation, as previously reported.<sup>19,20</sup> Briefly, HLA heterodimers were incubated with a biotinylated indicator peptide and serial dilutions of competitor peptides. As reference, the unlabeled form of biotinylated reporter peptide was used as an internal control. After 24 h incubation at 37°C, samples were neutralized with 450 mM Tris HCl (pH 7.5) (Sigma, St Quentin-Fallavier, France), 0.3% bovine serum albumin (Sigma), and 1 mM n-dodecyl  $\beta$ -D-maltoside buffer (Sigma) and applied to 96-well MaxiSorp ELISA plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) coated with 10  $\mu$ g/mL L243. Bound biotinylated peptide was detected by streptavidin-alkaline phosphatase conjugate (GE Healthcare, Saclay, France) after adding 4-methylumbelliferyl phosphate substrate (Sigma). Emitted fluorescence was measured at 450 nm upon excitation at 365 nm. The peptide concentration that prevented binding of 50% of the biotinylated peptide ( $IC_{50}$ ) was evaluated. The sequence of the biotinylated reporter hemagglutinin (HA) peptide was <sup>306</sup>PKYVKQNTLKLAT<sup>318</sup>; the mean  $IC_{50}$  values of the HA<sup>306-318</sup> peptide for HLA DRB1\*01:01 and DRB1\*11:01 binding were 4.61 and 37.42 nM, respectively. For HLA DRB1\*15:01, the sequence of the reporter biotinylated peptide A3<sup>152-166</sup> was <sup>152</sup>EAEQLRAYLDGTGVE<sup>166</sup> with an  $IC_{50}$  value of 41.46 nM. Means and standard errors of the means were calculated from three independent experiments. Binding data are estimated as relative affinities defined as the ratio of the  $IC_{50}$  of each individual peptide to the  $IC_{50}$  of the reference peptide. Peptides with relative affinities of 20 or less were considered as strong binders to the HLA-DRB1 molecules and were retained for the rest of the study.

### Human samples

Heparinized blood from healthy donors (EFS, Ile-de-France, Créteil, France) or from TTP patients (French national reference center for TMA, Prof. P. Coppo, St Antoine Hospital, Paris, France and Dr L. Galicier, St Louis Hospital, Paris, France) was obtained after written informed consent. The use of samples for research purposes had been approved by the ethical committee from Saint-Antoine Hospital (Authorization n. 04807/12/2005). The criteria for diagnosing acquired TTP were those previously reported,<sup>4</sup> and



**Figure 1. Identification of HLA-DR1-restricted T-cell epitopes using ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas.** (A) Anti-ADAMTS13 IgG titers in Sure-L1 mice immunized with rhADAMTS13. The serum from an HLA-DR1-transgenic Sure-L1 mouse immunized with rhADAMTS13 was incubated in serial dilutions on ADAMTS13-coated ELISA wells. ADAMTS13-bound IgG were detected using horseradish peroxidase-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG and substrate. Results are expressed in arbitrary units as optical density measured at 492 nm. (B) Activation of ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas. A representative ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma (clone 2G10 $\delta$ ) was incubated with AAPC<sup>DR1</sup> (10:1 ratio) and ADAMTS13-derived peptides as listed in Table 1. Stimulation indices represent the ratio of IL-2 secreted by the T cells measured by ELISA upon incubation with ADAMTS13 peptides over IL-2 secreted in the absence of peptide. Means $\pm$ SD are from two independent experiments. (C) Delineation of the core peptide for ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas. A representative ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma (clone 2G10 $\delta$ ) was incubated with AAPC<sup>DR1</sup> and overlapping 15-mer peptides spanning the 1235-1256 peptide sequence. Stimulation indices were assessed as explained above.

included a severe deficiency (<5% of normal activity) of ADAMTS-13 activity along with a detectable inhibitor and/or detectable serum antibodies as assessed by ELISA (Technozym R ADAMTS13 INH, Technoclone, Vienna, Austria; threshold positivity >15 U/mL).

### Blood processing

All blood samples were shipped at room temperature within 4 h of being drawn. HLA-DR screening was performed by molecular typing using the Olerup SSP HLA\*DR kit (Olerup SSP, Stockholm, Sweden) after extracting DNA from total blood (Qiagen, Vienna, Austria). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by density gradient centrifugation on lymphocyte separation medium (PAA Laboratories GmbH, Les Mureaux, France) and immediately frozen in pooled human male AB serum containing 10% dimethylsulfoxide (Sigma).

### Immunization of mice

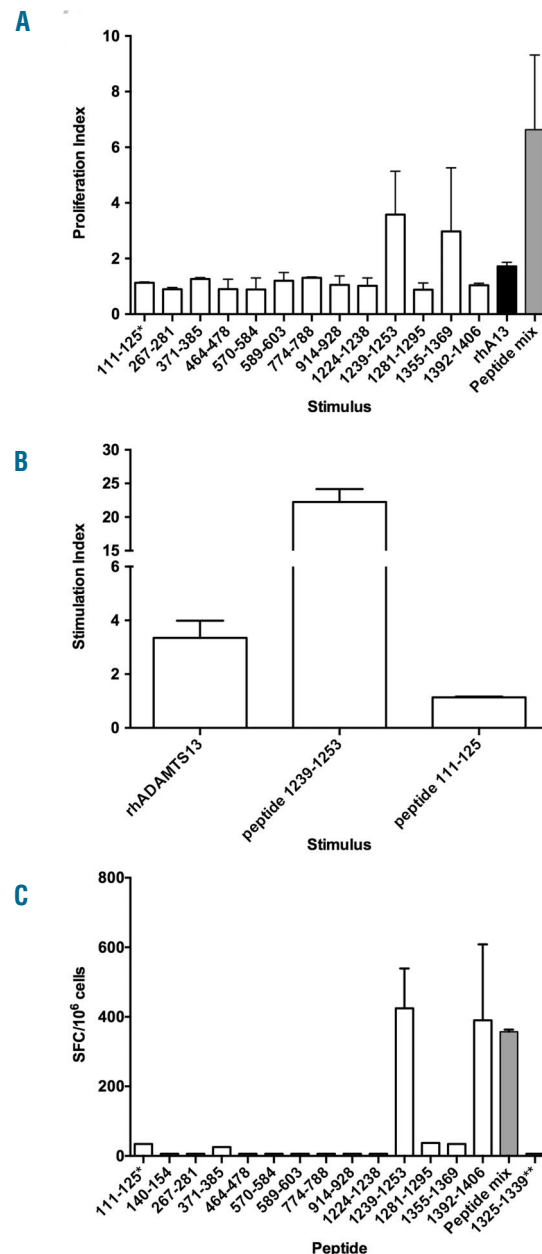
The animals used in this study were HLA-A2.1/HLA-DR1-transgenic H-2 class I/class II (IA  $\beta$ -/-  $\beta$ 2m-/-)-knockout mice (Sure-L1 mice), 8 to 12 weeks old.<sup>21</sup> The mice were immunized subcutaneously with 150  $\mu$ g of rhADAMTS13 in complete Freund's adjuvant (Sigma), and 15 days later with 150  $\mu$ g rhADAMTS13 in incomplete Freund's adjuvant (Sigma). Blood was drawn by retro-orbital bleeding 4 days after the second administration of rhADAMTS13 and cells from the spleen and draining lymph nodes were collected. Animals were handled in agreement with local ethical authorities (Comité Régional d'Éthique p3/2005/002).

### Titration of anti-ADAMTS13 IgG

Antibodies against human ADAMTS13 were measured in mice serum using ELISA. Briefly, ELISA plates were coated with rhADAMTS13 (1  $\mu$ g/mL) for 1 h at 37°C and subsequently blocked for an additional hour with phosphate-buffered saline - 1% bovine serum albumin (PBS-BSA). Serum serially diluted in PBS-BSA (dilution factor: 1/3) was then incubated for 1 h at room temperature. Bound IgG was revealed using a secondary horseradish peroxidase-coupled goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG antibody (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) and substrate. The mouse monoclonal anti-human ADAMTS13 IgG monoclonal antibody 20A5 (HYCULT, Uden, NL) was used as a positive control.

### HLA-DRB1\*01:01-positive antigen-presenting cells

Three different sources of antigen-presenting cells were used for T-cell presentation assays: (i) purified splenocytes from Sure-L1 mice inactivated with mitomycin C (50  $\mu$ g/mL, Sigma), (ii) immature Mo-DC from HLA-DRB1\*01:01 healthy donors inactivated with mitomycin C (50  $\mu$ g/mL), and (iii) artificial antigen-presenting cells derived from the NIH-3T3 cell line expressing HLA-DRB1\*01:01 (AAPC<sup>CDR1</sup>). To generate AAPC<sup>CDR1</sup>, NIH-3T3 cells were transduced with the common HLA-DR $\alpha$  chain and the specific HLA-DR $\beta$ 1\*01:01 chain, and with the co-stimulatory and adhesion human molecules B7.1, ICAM-1 and LFA-3.<sup>22</sup> AAPC<sup>CDR1</sup> does not produce murine interleukin-2 and does not, therefore, require inactivation with mitomycin C. Its ability to present and stimulate HLA-DRB1\*01:01-restricted CD4<sup>+</sup> T cells efficiently has been demonstrated.<sup>22</sup> In the case of Mo-DC, human monocytes were isolated from peripheral blood mononuclear cells using anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% human AB Serum (Sigma), L-glutamine and antibiotics (Life Technologies - Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in the presence of 500 IU human recombinant interleukin 4 (ImmunoTools,



**Figure 2. The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is an immunodominant T-cell epitope both for Sure-L1 mice as well as for a patient with TTP.** (A) Stimulation by ADAMTS13-derived peptides of spleen and lymph node cells from Sure-L1 mice immunized with rhADAMTS13. Cells (3x10<sup>5</sup>/well) were incubated with each individual peptide (10  $\mu$ g/mL), with the pool of peptides (Peptide mix) or with rhADAMTS13. Proliferation was assessed by incorporation of tritiated thymidine. Proliferation indices are defined as the ratio of cpm of stimulated cells versus cpm of control cells, and are expressed as means $\pm$ SD for two Sure-L1 mice. (B) The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is processed and presented to T cells by human antigen-presenting cells. A representative ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma (clone 1F5y) was incubated with immature dendritic cells from a healthy HLA-DR1<sup>+</sup> blood donor and with the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide, with rhADAMTS13 or with the ADAMTS13<sup>111-125</sup> peptide. Stimulation indices represent the ratio of secretion of IL-2 by T cells stimulated in the presence of antigen versus the secretion of IL-2 by T cells incubated with Mo-DC alone. Means $\pm$ SD are from two independent experiments. Similar results were obtained with other ADAMTS13-CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma clones (not shown). The peptide incubated alone or with DR1<sup>+</sup> artificial antigen-presenting cells failed to activate the T cells (not shown). (C) ADAMTS13 epitope specificity of CD4<sup>+</sup> T-cell lines from a patient with acquired TTP. CD4<sup>+</sup> T-cell lines were generated after stimulation with pooled ADAMTS13-derived peptides as defined in Table 1. T cells (3x10<sup>5</sup>/well) were then incubated with AAPC<sup>CDR1</sup> (3x10<sup>4</sup> cells/well) alone or pulsed with individual peptide (10  $\mu$ g/mL), or with the peptide pool (Peptide mix). The number of cells producing interferon- $\gamma$  was then assessed by ELISPOT and is expressed as the mean number of spot-forming cells (SFC) per million cells calculated in the case of peptide-stimulated T cells minus the SFC obtained in the case of unstimulated cells. Means $\pm$ SD are from two independent experiments. \*The 111-125 ADAMTS13-derived peptide that did not bind to HLA-DRB1\*01:01 was used as a negative control.

Friesoythe, Germany) and 1000 IU human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (ImmunoTools) per 10<sup>6</sup> cells. After 5 days of culture, the non-adherent immature Mo-DC-enriched fraction was harvested and the immature status was confirmed by the expression of the following surface phenotypic markers: CD40, CD80, CD86, CD83, CD1a and HLA-DR (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France), by flow cytometry as explained previously.<sup>23</sup>

### Proliferation response to ADAMTS13-derived peptide

Cells from the spleen and draining lymph nodes from immunized Sure-L1 mice were pooled. Cells (10<sup>5</sup> cells/well) were incubated alone, with each individual synthetic ADAMTS13-derived peptide (10 µg/mL) or with a pool containing all the peptides (2.5 µg/mL of each peptide) in AIM-V medium (Life Technologies) for 4 days. Cell proliferation was determined by incorporation of <sup>3</sup>H-thymidine (1 µCi per well, specific activity of 6.7 Ci/mmol) added during the final 16 h and measured as counts per minute (cpm) on a micro-β-counter (Perkin Elmer Applied Biosystems). Stimulation indices (SI) were calculated as the ratio between the cpm in the presence of a stimulus, and the average cpm of the same cells incubated alone.

### Generation of mouse ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas

Cells from draining lymph nodes of immunized Sure-L1 mice were stimulated for 72 h with rhADAMTS13 (1 µg/mL) and fused with the BWZ.<sup>36</sup> fusion (TCR<sup>-/-</sup>) partner cell line<sup>24</sup> (a kind gift from Prof N Shastri, University of California, Berkeley, CA, USA) using polyethylene glycol. ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas were obtained after culture in HAT and HT selective media (both from Sigma). Specificity for ADAMTS13 was evaluated using a T-cell stimulation assay.

### T-cell hybridoma stimulation assay

Mouse HLA-DR1-restricted CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas (10<sup>5</sup> cells/well) were cultured in plates of 96 round-bottomed wells with 10<sup>4</sup> (ratio 1:10) DRB1\*01:01 antigen-presenting cells (splenocytes or immature Mo-DC) in the presence of rhADAMTS13 (10 µg/mL) for 24 h at 37°C. Murine interleukin-2 secreted by activated T cells was measured in the supernatant using an ELISA kit according to the manufacturer's protocol (eBioscience, Paris, France). The positive control was concanavalin A (Sigma) at a concentration of 1 µg/mL. For each hybridoma cell line growing in HAT media, the stimulation index was calculated. Hybridoma clones with an at least 2-fold increase in interleukin-2 release (ratio between ADAMTS13-stimulated cultures and control medium) were considered to be ADAMTS13-specific and were subsequently sub-cloned by limiting dilution (0.5 cells/well). Among ADAMTS13-specific T-cell hybridomas, screening for peptide specificity was realized with AAPC<sup>DR1</sup> co-cultured for 24 h with peptides at 10 µg/mL, and interleukin-2 secretion by activated T-cell hybridomas was measured in the supernatant with the same ELISA kit.

### Generation of ADAMTS13-specific human CD4<sup>+</sup> T-cell lines

Using the accelerated co-cultured dendritic cell assay,<sup>25</sup> peripheral blood mononuclear cells from a TTP patient were stimulated for 10 days with the pool of 16 ADAMTS13-derived peptides (2.5 µg/mL for each peptide). Briefly, cells (5x10<sup>6</sup> cells/mL) were thawed and cultured in AIM-V medium supplemented with 1000 U/mL of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 500 U/mL of interleukin-4 (ImmunoTools). After 24 h (day 1), the pool of ADAMTS13-derived peptides was added along with tumor necrosis factor-α (1000 U/mL), interleukin-1β (10 ng/mL),

interleukin-7 (0.5 ng/mL) (ImmunoTools) and prostaglandin E2 (1 µM; Merck Calbiochem, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). On day 10, non-adherent cells were collected, washed, and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were isolated by negative magnetic purification with a CD4<sup>+</sup> T-cell isolation kit (Miltenyi). Cells were then incubated with irradiated DRB1\*01 Mo-DC (45 Gy) from healthy donors (ratio 1:10), pulsed with the pool of ADAMTS13-derived peptides, in fresh AIM-V at 37°C for 6 h. Subsequently, CD4<sup>+</sup> T cells reactive to ADAMTS13-derived peptides were isolated using the interferon (IFN)-γ secretion assay-cell detection kit according to the manufacturer's protocol (Miltenyi). Cell lines were obtained after culture of the IFN-γ-secreting cells in AIM-V medium supplemented with 10% human AB serum, interleukin-2 (20 U/mL), interleukin-4 (5 ng/mL), anti-CD3 monoclonal antibody (OKT3, 30 ng/mL) (ImmunoTools) and irradiated (45 Gy) peripheral blood mononuclear cells from two unrelated donors. Cells were fed every 7 days with fresh cytokines. The stimulated CD4<sup>+</sup> T cells were tested after ~3 weeks for peptide specificity by IFN-γ enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assays after incubation with peptide-pulsed or non-pulsed antigen-presenting cells.

### Enzyme-linked immunospot assays

The human IFN-γ ELISPOT assay was performed according to the manufacturer's recommendations. Ninety-six-well polyvinylidene fluoride plates (Millipore-Merck) were pre-wetted with ethanol. The individual ADAMTS13-derived peptides (10 µg/mL), the peptide pool, or medium alone were plated in triplicate wells, into the plates that had been pre-coated overnight with the anti-IFN-γ capture antibody (U-CyTech, Utrecht, the Netherlands) and blocked with AIM-V plus 10% human serum. Irradiated AAPC<sup>DR1</sup> (45 Gy) were then seeded and incubated (3x10<sup>4</sup>/well) with the CD4<sup>+</sup> T-cell line (3x10<sup>5</sup>/well) for 24 h at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator. Following removal of peripheral blood mononuclear cells, IFN-γ secretion was visualized with a biotin-conjugated anti-IFN-γ antibody (U-CyTech), alkaline phosphatase-conjugated ExtrAvidin, and Sigmafast 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) tablets (Sigma). Plates were then air dried and scanned on an ImmunoSpot Analyzer (CTL, Shaker Heights, OH, USA). Spot-forming cells were automatically calculated by ImmunoSpot Software using the SmartCount™ and Autogate™ functions.<sup>26</sup> ELISPOT readouts are expressed as spot-forming

**Table 2.** Affinity of ADAMTS13<sup>1329-1253</sup> peptide for HLA-DRB1 molecules.

| HLA-DR molecule <sup>a</sup> | Predicted binding score <sup>b</sup> | Relative affinity <sup>c</sup> |
|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| DRB1*11:01                   | 1.2                                  | 16.04                          |
| DRB1*15:01                   | 1.40                                 | 3.48                           |
| DRB1*13:01                   | 1.72                                 | ND                             |
| DRB1*08:01                   | 4.47                                 | ND                             |
| DRB1*01:01                   | 7.08                                 | 0.27                           |
| DRB1*03:01                   | 7.92                                 | ND                             |
| DRB1*04:01                   | 12.10                                | ND                             |
| DRB1*12:01                   | 25.89                                | ND                             |
| DRB1*07:01                   | 31.19                                | ND                             |
| DRB1*09:01                   | 33.67                                | ND                             |

<sup>a</sup>HLA-DRB1 molecules are classified based on their predicted binding score. <sup>b</sup>Binding scores were generated by IEDB using the consensus method prediction tool. <sup>c</sup>Binding data are estimated as relative affinities defined as the ratio of the IC<sub>50</sub> of the ADAMTS13<sup>1329-1253</sup> peptide to the IC<sub>50</sub> of each reference peptide. Relative affinities of 20 or less were considered high binders to the HLA-DR molecule. The sequences and mean IC<sub>50</sub> values of the reference peptides were the following: HA<sup>296-318</sup> (PKYVKQNTLKLAT) for DR1 (4.61 nM) and DR11 (37.42 nM); A3<sup>152-166</sup> (EAEQLRAYLDGTGVE) for DR15 (41.46 nM). ND: not done.

cells/ $10^6$  CD4<sup>+</sup> T-cells. Peptides that generated at least twice the spot-forming cells over the control wells were defined as eliciting a positive response.

## Results

### Few ADAMTS13-derived peptides are strong binders to HLA-DRB1\*01:01 molecules

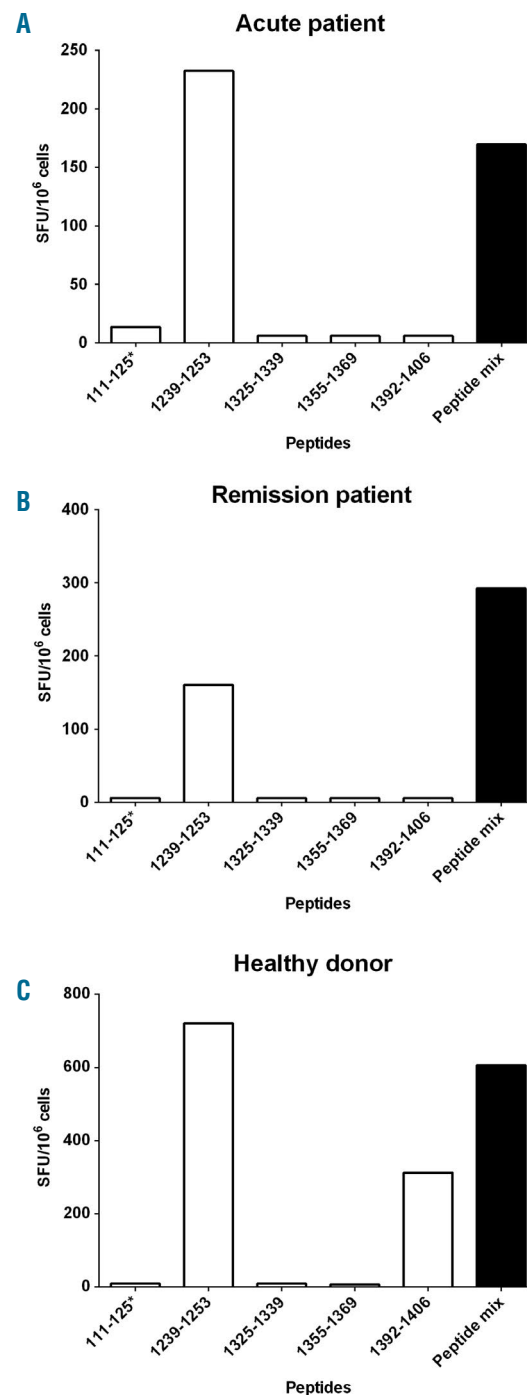
We hypothesized that the T-cell epitopes of rhADAMTS13 correspond to ADAMTS13-derived peptides that bind stably to the groove of class II MHC molecules. The candidate peptides should thus bind with a high affinity to HLA-DR molecules. Using the IEDB consensus method prediction tool for MHC class II binding, we first predicted the array of ADAMTS13-derived 15-mer peptides that bind to the HLA-DRB1\*01:01 (DR1) allele. Altogether, 15 15-mer peptides with unique core sequences were predicted to be strong binders to HLA-DR1 with binding scores below 10 (Table 1). The corresponding synthetic 15 peptides were used in binding assays to determine *in vitro* affinities for purified HLA-DRB1\*01:01 molecules by competition ELISA. The calculated  $IC_{50}$  values ranged from 0 to 5000 nM (Table 1). Five peptides bound to DR1 with an  $IC_{50}$  below 4 nM, an affinity greater than that of the influenza HA<sup>306-318</sup> control peptide ( $IC_{50}$  = 4.61 nM). Three peptides revealed a poor binding capacity with  $IC_{50}$  values 20-fold greater than that of the HA control peptide, despite a good IEDB-predicted binding score.

### ADAMTS13-derived peptides activate ADAMTS13-specific mouse CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas restricted to HLA-DRB1\*01:01

To assess whether the ADAMTS13-derived HLA-DR1 binding peptides are T-cell epitopes and are presented to T cells by antigen-presenting cells, we generated ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas restricted to the HLA-DR1 allele. Induction of an anti-rhADAMTS13 immune response in a humanized transgenic HLA-DR1 mouse was confirmed by ELISA (Figure 1A). Cells from the draining lymph nodes were fused to a TCR<sup>α</sup> partner (BWZ36) and 95 CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas were selected. Among them, 26 hybridomas produced interleukin-2 following incubation with splenocytes from Sure-L1 mice in the presence of rhADAMTS13. The 26 hybridomas were subsequently sub-cloned.

We next evaluated the activation of the T-cell hybridomas by the 15-mer peptides. The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide was the only peptide to induce a significant secretion of interleukin-2 in all the hybridoma cell lines tested (6 of the 26 rhADAMTS13-reactive T-cell hybridomas; a representative result is shown for 1 T cell-hybridoma in Figure 1B). To delineate the T-cell epitope recognized by the T-cell hybridomas more precisely, overlapping 15-mer peptides that span amino acids 1235 to 1256 were synthesized and assessed for their capacity to activate one of the T-cell hybridomas (Clone 2G108). Significant T-cell activation was observed for peptides 1237-1251, 1238-1252, 1239-1253, 1240-1254 and 1241-1255 (Figure 1C). Conversely, peptides 1235-1249, 1236-1250 and 1242-1256 failed to activate the T-cell hybridoma. Similar results were obtained with another T-cell hybridoma (clone 1F5γ, *data not shown*). These results demonstrate that the minimal core peptide sequence recognized by the

ADAMTS13-specific DRB1\*01:01-restricted T-cell hybridomas is <sup>1241</sup>MLLLWGRLTWR<sup>1251</sup>. Anchor residues for binding of peptide 1239-1253 to the HLA groove are highlighted in Table 1: L1, W4, R6 and W9.



**Figure 3. The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is an immunodominant T-cell epitope for HLA-DRB1\*11 individuals.** CD4<sup>+</sup> T-cell lines from HLA-DRB1\*11 TTP patients at (A) acute phase or (B) in remission phase of the disease, or from (C) a HLA-DRB1\*11 healthy donor, were stimulated with the ADAMTS13-derived peptides identified as immunodominant for HLA-DRB1\*01. T cells ( $3 \times 10^5$  cells/well) were incubated with AAPC<sup>DRB11</sup> ( $3 \times 10^4$  cells/well) alone or pulsed with individual peptide (10  $\mu$ g/mL), or with the peptide pool (Peptide mix). The number of cells producing interferon- $\gamma$  was then assessed by ELISPOT and is expressed as mean number of spot-forming cells (SFC) per million cells calculated in the case of peptide-stimulated T-cells minus the SFC obtained in the case of unstimulated cells. \*The 111-125 ADAMTS13-derived peptide is used as a negative control, without detectable binding to HLA-DRB1\*11:01 (*data not shown*).

### The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is recognized by CD4<sup>+</sup> T cells from humanized Sure-L1 HLA-DRB1\*01:01 mice

We next asked whether other peptides than the one identified using the hybridoma technology may be recognized by polyclonal CD4<sup>+</sup> T cells from Sure-L1 mice immunized with rhADAMTS13. Splenocytes and cells from the draining lymph nodes from three immunized Sure-L1 mice were stimulated with the individual ADAMTS13-derived peptides previously identified to bind to HLA-DRB1\*01:01 with a high affinity. Significant cell proliferation was observed in the case of ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide (Figure 2A), confirming that this peptide is a dominant CD4<sup>+</sup> T-cell epitope, at least in mice.

### The ADAMTS13 T-cell epitope identified in humanized Sure-L1 HLA-DRB1\*01:01 mice is presented by human antigen-presenting cells

We then investigated whether the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is generated by professional human antigen-presenting cells and presented to CD4<sup>+</sup> T cells in an HLA-DRB1\*01:01 context. To this end, immature HLA-DRB1\*01:01 Mo-DC were incubated with rhADAMTS13 and with T-cell hybridomas of known specificity for the 1239-1253 peptide. T cells incubated with Mo-DC in the presence of the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide presented with a stimulation index of  $22.2 \pm 1.9$  (Figure 2B). In contrast, incubation of the cells with the ADAMTS13<sup>111-125</sup> control peptide did not result in T-cell activation (stimulation index:  $1.1 \pm 0.0$ ). Interestingly, incubation of T cells and Mo-DC with rhADAMTS13 induced T-cell activation with a stimulation index of  $3.3 \pm 0.6$ , indicating that rhADAMTS13 is efficiently processed by human antigen-presenting cells, and that the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is readily generated.

### The ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is a dominant T-cell epitope in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura with the HLA-DRB1\*01:01 allele

We then assessed whether the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is recognized by CD4<sup>+</sup> T cells from patients with acquired TTP. CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes were isolated from the blood of a 43-year-old HLA-DRB1\*01:01 male, 14 days after the onset of acute acquired TTP. ADAMTS13 activity in this patient was less than 5% of the normal value due to the presence of inhibitory antibodies directed to ADAMTS13. A CD4<sup>+</sup> T-cell line specific for ADAMTS13-derived peptides was amplified from the patient's peripheral blood mononuclear cells as explained. After 32 days of culture, the CD4<sup>+</sup> T-cell line produced IFN- $\gamma$ , as assessed by ELISPOT, following incubation with Mo-DC from HLA-DR1 healthy donors, pulsed with the pool of ADAMTS13-derived peptides with high binding affinity for HLA-DR1, but failed to produce IFN- $\gamma$  when incubated with Mo-DC alone (*data not shown*). We then incubated the T-cell lines with AAPC<sup>DR1</sup> and with each individual peptide. Together with the ADAMTS13<sup>1392-1406</sup> peptide, the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> was the only peptide able to activate human IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2C). Similar results were obtained when the T cells and ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide were incubated in the presence of HLA-DR1 Mo-DC (*data not shown*). Further evaluation of the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide by IEDB predicted good binding scores to HLA-DR11, 15, 13, 8, 3 and 4, which

was confirmed in competitive ELISA at least in the case of HLA-DR11 and HLA-DR15 (Table 2). T-cell lines were also generated from one female TTP patient in acute phase (aged 19, Figure 3A), one female TTP patient in remission phase (aged 34, Figure 3B) and one 25-year old, healthy male donor (Figure 3C), all with the HLA-DRB1\*11:01 allele. Reactivity towards the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide was detected in the case of the three individuals. Together, our data suggest that the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide is a dominant and promiscuous T-cell epitope in TTP patients.

## Discussion

In the present study, we delineated the ADAMTS13-derived peptides that are potent T-cell epitopes in the context of the HLA-DR1 haplotype. An array of ADAMTS13-derived peptides that are processed and presented by Mo-DC had been previously reported in the case of healthy donors with different HLA-DR haplotypes.<sup>13</sup> As many as 11 core peptides had thus been retrieved from the HLA-DR-binding groove; the peptides spanned six different domains of ADAMTS13. In order to identify HLA-DR-restricted T-cell epitopes of ADAMTS13, we took advantage of the humanized Sure-L1 mouse strain. Sure-L1 mice are invalidated for murine MHC class I and II molecules and transgenic for HLA-DRB1\*01:01. HLA transgenic mice have been proven to be an appropriate human counterpart for the characterization of T-cell epitopes derived from pathogens<sup>21</sup> as well as therapeutic proteins.<sup>27</sup> In agreement with this, our results demonstrate that the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide, identified as an immunodominant T-cell epitope using *in silico* prediction, *in vitro* binding assays and T-cell hybridoma generation, is processed by human Mo-DC *in vitro* and activates CD4<sup>+</sup> T cells both *in vivo* in Sure-L1 mice, and *ex vivo* in the case of cells from patients with TTP.

The *in silico* selection of the ADAMTS13-derived peptides was based on the hypothesis that the T-cell epitope of rhADAMTS13 binds with a high affinity to HLA-DR molecules. The prediction efficiency of IEDB for HLA class II-binding peptides has been validated for various antigens, including human plasma proteins, and correlates adequately with HLA binding, as measured by competitive ELISA.<sup>15-17</sup> For instance, T-cell epitopes of the human pro-coagulant factor VIII were identified using the hybridoma technology in an HLA-DR15 transgenic mouse model upon screening a peptide library spanning the entire sequence of the protein.<sup>27</sup> Our unpublished data demonstrate a strong correlation between the predicted IEDB binding score for HLA-DR15 and the CD4<sup>+</sup> T-cell epitope found in this work through hybridoma technology (area under the receiver operating characteristic curve=0.90). *In silico* prediction may nevertheless be over-predictive and positively select peptides that do not activate T cells.<sup>28</sup>

In the case of ADAMTS13, HLA-DR11 has been identified as a major risk factor for TTP. Sorvillo *et al.* identified 11 hypothetical T-cell epitopes following purification from HLA-DR molecules expressed by ADAMTS13-loaded Mo-DC from healthy donors with several HLA haplotypes.<sup>13</sup> The ADAMTS13-derived core sequence 1328FINVAPHAR<sup>1336</sup> was shown to be preferentially presented by the HLA-DR11 molecule,<sup>13</sup> and stimulated CD4<sup>+</sup> T

cells from at least one TTP patient.<sup>14</sup> In our hands, the ADAMTS13<sup>1325-1339</sup> peptide, that contains the same core sequence, was predicted to be a strong binder to HLA-DR1 peptide. However, it failed to bind HLA-DRB1\*01:01 and to activate human CD4<sup>+</sup> T cells from a DRB1\*01:01 patient. Besides, the ADAMTS13<sup>1325-1339</sup> peptide did not activate CD4<sup>+</sup> T cells from two TTP patients with the HLA-DRB11 allele. Whether this results from differences in peptide length and in the nature of the residues adjacent to the core peptide remains to be determined.<sup>29,30</sup>

Our rationale for focusing our study on the HLA-DRB1\*01:01 allele is justified by the availability of an appropriate transgenic HLA-DRB1\*01:01 mouse model, and by the fact that the HLA-DRB1\*01:01 allele is found in 18% of the patients with acquired TTP<sup>10</sup> and in 15 to 30% of the Caucasian population.<sup>31</sup> Interestingly, 11 of the 15 peptides predicted to bind HLA-DR1 by IEDB were also predicted to have a high affinity for the HLA-DRB1\*11:01 allele. In particular, the unique immunodominant HLA-DRB1\*01:01-associated T-cell epitope characterized in our work, ADAMTS13<sup>1239-1253</sup>, had an excellent binding score to HLA-DRB1\*11:01 (score of 1.2) and HLA-DRB1\*15:01, strong affinity for HLA-DRB1\*11:01 and HLA-DRB1\*15:01 in competitive ELISA (Table 2), and was a target epitope of CD4<sup>+</sup> T cells from two TTP patients and one healthy donor with the HLA-DRB11 allele. Of note, the ADAMTS13<sup>1240-1252</sup> peptide, which shares the identical core peptide with the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide, was identified by the study of Sorvillo *et al.* in the case of Mo-DC from a patient with the HLA-DR4/DR13 haplotype.<sup>13</sup> Together with our IEDB prediction, the data suggest that the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide exhibits promiscuity for at least three HLA-DR alleles: DR1, DR11 and DR15. Additional work including more HLA-DR alleles is required to determine whether pathogenic recognition of ADAMTS13 by CD4<sup>+</sup> T cells is principally directed to promiscuous immunodominant epitopes such as the

ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide, or whether private T-cell epitopes dominate in the case of HLA-DR alleles that are predominantly associated with acquired TTP.

We cannot exclude the existence of additional immunodominant T-cell epitopes potentially overlooked in our experimental approach. Besides, additional work is required to link our findings to the Th2 polarization of CD4<sup>+</sup> T cells and production of anti-ADAMTS13 autoantibodies. Nevertheless, identification of the ADAMTS13<sup>1239-1253</sup> peptide as a promiscuous immunodominant T-cell epitope may have clinical implications at term. It should pave the way towards the characterization of the ADAMTS13-specific CD4<sup>+</sup> T-cell response in TTP patients using ADAMTS13<sup>1239-1253</sup>-loaded HLA-DR tetramers. Such a tool would provide new insights into the mechanisms involved in the breakdown of tolerance to ADAMTS13 and should be of clinical relevance for following, in a quantitative manner, populations of ADAMTS13-specific T cells in the course of TTP treatment and anticipate relapse. In particular, confirmation of our results would lead to identification of prognostic factors (persistence of specific Th17 T cells, generation of regulatory T cells) that would help in the decision process regarding pre-emptive use of rituximab to prevent relapse.<sup>32</sup>

### Acknowledgments

We thank Professor John Robinson (Newcastle University, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) for his advice about generating the ADAMTS13-specific T-cell hybridomas.

### Funding

This study 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 the 2012 Prof. Heimbürger Award from CSL-Behring (Marburg, Germany). LG was the recipient of a « Poste d'accueil INSERM » fellowship and Bourse Marcel Simon - Société Française de Médecine Interne (SNFMI).

## References

1. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1998; 339(22):1585–1594.
2. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, et al. Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1998;91(8):2839–2846.
3. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature.* 2001; 413(6855):488–494.
4. Coppo P, Bengoufa D, Veyradier A, et al. Severe ADAMTS13 deficiency in adult idiopathic thrombotic microangiopathies defines a subset of patients characterized by various autoimmune manifestations, lower platelet count, and mild renal involvement. *Medicine (Baltimore).* 2004;83(4):233–244.
5. Zheng XL, Wu HM, Shang D, et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2010; 95(9):1555–1562.
6. Ferrari S, Palavra K, Gruber B, et al. Persistence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2014; 99(4):779–787.
7. Thomas MR, de Groot R, Scully MA, et al. Pathogenicity of anti-ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *EBioMedicine.* 2015;2(8):942–952.
8. Pos W, Crawley JTB, Fijnheer R, et al. An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood.* 2010; 115(8):1640–1649.
9. Pos W, Luken BM, Sorvillo N, et al. Humoral immune response to ADAMTS13 in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2011;9(7):1285–1291.
10. Coppo P, Bussan M, Veyradier A, et al. HLA-DRB1\*11: a strong risk factor for acquired severe ADAMTS13 deficiency-related idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in Caucasians. *J Thromb Haemost.* 2010;8(4):856–859.
11. Scully M, Brown J, Patel R, et al. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J Thromb Haemost.* 2010;8(2):257–262.
12. John M-L, Hitzler W, Scharrer I. The role of human leukocyte antigens as predisposing and/or protective factors in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol.* 2012; 91(4):507–510.
13. Sorvillo N, van Haren SD, Kaijen PH, et al. Preferential HLA-DRB1\*11-dependent presentation of CUB2-derived peptides by ADAMTS13-pulsed dendritic cells. *Blood.* 2013;121(17):3502–3510.
14. Verbij FC, Turksma AW, de Heij F, et al. CD4<sup>+</sup> T cells from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura recognize CUB2 domain-derived peptides. *Blood.* 2016;127(12):1606–1609.
15. Wang P, Sidney J, Dow C, et al. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol.* 2008;4(4):e1000048.
16. Wang P, Sidney J, Kim Y, et al. Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:568.
17. Vita R, Overton JA, Greenbaum JA, et al. The immune epitope database (IEDB) 3.0.

- Nucleic Acids Res. 2015;43(Database issue):D405–412.
18. Plaimauer B, Kremer Hovinga JA, Juno C, et al. Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies. *J Thromb Haemost.* 2011;9(5):936–944.
  19. Texier C, Pouvelle-Moratille S, Busson M, et al. Complementarity and redundancy of the binding specificity of HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 molecules. *Eur J Immunol.* 2001;31(6):1837–1846.
  20. Texier C, Pouvelle S, Busson M, et al. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. *J Immunol.* 2000; 164(6):3177–3184.
  21. Pajot A, Michel M-L, Fazilleau N, et al. A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. *Eur J Immunol.* 2004;34(11):3060–3069.
  22. Garnier A, Hamieh M, Drouet A, et al. Artificial antigen-presenting cells expressing HLA class II molecules as an effective tool for amplifying human specific memory CD4(+) T cells. *Immunol Cell Biol.* 2016;94(7):662–672.
  23. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, et al. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood.* 2003; 101(2):758–765.
  24. Sanderson S, Shastri N. LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int Immunol.* 1994;6(3):369–376.
  25. Martinuzzi E, Afonso G, Gagnerault M-C, et al. acDCs enhance human antigen-specific T-cell responses. *Blood.* 2011; 118(8):2128–2137.
  26. Lehmann PV. Image analysis and data management of ELISPOT assay results. *Methods Mol Biol.* 2005;302:117–32.
  27. Steinitz KN, van Helden PM, Binder B, et al. CD4+ T-cell epitopes associated with antibody responses after intravenously and subcutaneously applied human FVIII in humanized hemophilic E17 HLA-DRB1\*1501 mice. *Blood.* 2012 26;119(17):4073–4082.
  28. Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. Predictions versus high-throughput experiments in T-cell epitope discovery: competition or synergy? *Expert Rev Vaccines.* 2012;11(1):43–54.
  29. Carson RT, Vignali KM, Woodland DL, et al. T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity.* 1997;7(3):387–399.
  30. Holland CJ, Cole DK, Godkin A. Redirecting CD4(+) T cell responses with the flanking residues of MHC class II-bound peptides: the core is not enough. *Front Immunol.* 2013;4:172.
  31. González-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D784–788.
  32. Hie M, Gay J, Galicier L, et al. Preemptive rituximab infusions after remission efficiently prevent relapses in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2014;124(2):204–210.

ORIGINAL ARTICLE *Clinical haemophilia*

# *In silico* calculated affinity of FVIII-derived peptides for HLA class II alleles predicts inhibitor development in haemophilia A patients with missense mutations in the F8 gene

A. D. PASHOV,\*†‡§ T. CALVEZ,¶ L. GILARDIN,\*†‡ B. MAILLÈRE,\*\* Y. REPESSÉ,††  
J. OLDENBURG,‡‡ A. PAVLOVA‡‡ and S. V. KAVERI \*†‡§§ and S. LACROIX-DESMAZES\*†‡§§  
ON BEHALF OF ABIRISK CONSORTIUM

\*Centre de recherche des Cordeliers, INSERM, UMR S 872; †Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR S 872; ‡Centre de Recherche des Cordeliers, Université Paris Descartes, UMR S 872, Paris, France; §Department of Immunology, Institute of Microbiology, BAS Sofia, Bulgaria; ¶Inserm et UPMC, UMR S 943, Paris; \*\*CEA, iBiTecS, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Labex LERMIT et VRI, Gif Sur Yvette; ††Laboratoire d'hématologie, CHU de Caen, Caen, France; ‡‡Institute of Experimental Haematology and Transfusion Medicine, University Clinic Bonn, Bonn, Germany; and §§International Associated Laboratory IMPACT (INSERM, France–Indian Council of Medical Research, India), National Institute of Immunohaematology, Mumbai, India

**Summary.** Forty per cent of haemophilia A (HA) patients have missense mutations in the F8 gene. Yet, all patients with identical mutations are not at the same risk of developing factor VIII (FVIII) inhibitors. In severe HA patients, human leucocyte antigen (HLA) haplotype was identified as a risk factor for onset of FVIII inhibitors. We hypothesized that missense mutations in endogenous FVIII alter the affinity of the mutated peptides for HLA class II, thus skewing FVIII-specific T-cell tolerance and increasing the risk that the corresponding wild-type FVIII-derived peptides induce an anti-FVIII immune response during replacement therapy. Here, we investigated whether affinity for HLA class II of wild-type FVIII-derived peptides that correspond to missense mutations described in the Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource database is associated with inhibitor development. We predicted the mean affinity for 10 major HLA class II alleles of

wild-type FVIII-derived peptides that corresponded to 1456 reported cases of missense mutations. Linear regression analysis confirmed a significant association between the predicted mean peptide affinity and the mutation inhibitory status ( $P = 0.006$ ). Significance was lost after adjustment on mutation position on FVIII domains. Although analysis of the A1-A2-A3-C1 domains yielded a positive correlation between predicted HLA-binding affinity and inhibitory status (OR = 0.29 [95% CI: 0.14–0.60] for the high affinity tertile,  $P = 0.002$ ), the C2 domain-restricted analysis indicated an inverse correlation (OR = 3.56 [1.10–11.52],  $P = 0.03$ ). Our data validate the importance of the affinity of FVIII peptides for HLA alleles to the immunogenicity of therapeutic FVIII in patients with missense mutations.

**Keywords:** factor VIII, immunogenicity, MHC class II, missense mutations, prediction, T-cell epitopes

## Introduction

Haemophilia A (HA) is a rare X-linked bleeding disorder that results from mutations in the gene encoding

pro-coagulant factor VIII (FVIII). Patients with HA are distinguished based on the residual levels of FVIII activity (FVIII:C) measured in their plasma as compared to normal plasma [1]. Thus, patients with a severe phenotype present with undetectable FVIII:C (<1%). Patients with moderate and mild HA in contrast have 2–5% and 5–40% of residual FVIII:C in plasma respectively. The heterogeneity of the population of HA patients is further increased by the fact that some patients with severe HA, referred to as cross-reactive material (CRM)-positive, present with circulating mutated molecules of FVIII, while others,

Correspondence: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMRS 872, Team 16, Centre de recherche des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, F-75006 Paris, France.  
Tel.: +33 1 44 27 82 02; fax: +33 1 44 27 81 94;  
e-mail: sebastien.lacroix-desmazes@crc.jussieu.fr

A. D. Pashov and T. Calvez contributed equally to the work.

Accepted after revision 10 September 2013

referred to as CRM-negative, do not. Such a phenotypic heterogeneity results from the large variety of genetic abnormalities that lead to FVIII inactivation. These include large and small deletions, single base substitutions leading to nonsense mutations, missense mutations or alteration of splicing sites, inversions of intron 1 or intron 22, and deletion/insertion of nucleotides [2].

Replacement therapy with exogenous human FVIII is the treatment of choice to control bleeding episodes in HA patients. Unfortunately, in 5–40% of the cases, the treatment is complicated by the development of an allo-immune response to the injected drug that culminates in the generation of inhibitory anti-FVIII antibodies of the IgG isotype [3]. The occurrence of FVIII inhibitors complicates the clinical management of the patients, aggravates their quality of life and considerably increases the costs of treatment [4].

The manner in which the immune system of an individual looks at FVIII is dictated by the very presence and nature of the endogenous molecule, and hence by the education that T and B lymphocytes undergo during their ontogeny in the thymus and bone marrow respectively. In healthy individuals, FVIII is presented to and recognized by the immune system. As a result, natural autoreactive anti-FVIII IgG [5,6] and FVIII-reactive T cells [7–9] circulate in some non-haemophilic individuals that are controlled by neutralizing anti-idiotypic antibodies [10,11] and regulatory T cells [12] (reviewed in [13]). The development of a pathogenic anti-FVIII immune response in non-haemophilic patients, referred to as ‘acquired haemophilia’, is therefore an extremely rare event, that occurs in less than five individual per million every year [14]. In contrast, the immune system of CRM-negative patients with HA, is not educated towards FVIII: anti-idiotypic B cell clones and regulatory T cells are presumably not generated and the patients have a high risk of alloimmunization to therapeutic FVIII, which has empirically been estimated between 15% and 50% [15]. Interestingly, CRM-positive patients with missense mutations, that constitute about 40% of HA patients [16], represent an intermediate situation: their immune system has been educated towards an ‘almost normal’ FVIII. When therapeutic wild-type FVIII is administered, with the controversial exception of differences in haplotypes [17,18], only the peptide of the exogenous FVIII molecule corresponding to the peptide of the endogenous FVIII that carries the missense mutation, does not face regulatory antibodies and T cells. The latter group of patients is thus partially tolerant to exogenous FVIII and presents with a lower risk of developing FVIII inhibitors, reported to range from 5% to 10%.

Several risk factors, both genetic and environmental, have been associated with the development of

FVIII inhibitors. The genetic risk factors include the severity of HA, and more particularly the type of genetic abnormality responsible for FVIII impairment [19], possibly haplotype mismatches between the endogenous FVIII of the patient and that of the therapeutic exogenous FVIII molecule [17,18], the presence of polymorphisms in the promoter of genes implicated in the regulation of the immune response (i.e. TNF- $\alpha$ , IL-10 and CTLA-4) [20–23] and some major histocompatibility complex (MHC) class II haplotypes of the human leucocyte antigen (HLA) system [23–26].

In the case of patients with missense mutations, some missense mutations have been associated with fourfold higher risk of inhibitor development as compared to other missense mutations [16,27]. However, all patients with the same mutation do not develop FVIII inhibitors following replacement therapy. Thus, in a study by Eckhardt *et al.*, of 52 patients with the Arg593Cys mutations, eight were found to develop inhibitors [27]. Interestingly, particular HLA class II haplotypes, such as HLA-DRB1\*01, DRB1\*11 and DRB1\*15, have been found at higher frequencies in cohorts of inhibitor-positive patients that shared the same missense mutation [28]. Taken together, these observations point towards the importance of the binding affinity, with the MHC class II molecules of the patients, of the exogenous peptides derived from therapeutic FVIII. In this study, we investigated whether the *in silico* predicted affinity of peptides derived from therapeutic FVIII for HLA class II alleles is associated with the occurrence of FVIII inhibitors in HA patients with missense mutations.

## Methods

### *HAMSTeRS database on FVIII mutations associated with haemophilia A*

The Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource (HAMSTeRS) is the largest repository in the public domain of genetic anomalies that are responsible for HA (<http://hadb.org.uk/>) [29]. At the point in time when the present analysis was performed, a total of 3783 cases were registered, representing 3747 cases with point mutations in the exons of the FVIII sequence (Table 1). These cases were further filtered from the analysis in that order: remove cases generating a nonsense codon (585 cases), keep in the analysis cases with confirmed antigen expression (i.e. FVIII:Ag and/or FVIII:C positive, 1129 cases), remove cases where inhibitory status associated with the mutation different from ‘no’ or ‘yes’ (571 cases), removing cases of silent mutations (three cases), removing mutations in the B domain (three cases – none associated with inhibitors). Thus, a total of 1456 cases were considered that corresponded to 500 different

**Table 1.** Algorithm for selecting appropriate cases from the HAMSTeRS database.

|                                                                                                                                                                                    | Number of cases remaining |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 1. All point mutation cases                                                                                                                                                        | 3783                      |
| 2. Remove mutations at position <1 and in introns                                                                                                                                  | 3747                      |
| 3. Remove changes to stop codons                                                                                                                                                   | 3162                      |
| 4. Remove cases for which FVIII:Ag is less than detection limit or unknown. If FVIII:Ag is unknown, cases for which if FVIII:C is less than detection limit or unknown are omitted | 2033                      |
| 5. Consider only cases with known inhibitor status                                                                                                                                 | 1462                      |
| 6. Remove remaining synonymous mutations                                                                                                                                           | 1459                      |
| 7. Omit mutations in the B domain                                                                                                                                                  | 1456                      |
| 8. Predict binding to 10 common HLA-DR-B1 alleles: 0101, 0301, 0401, 0701, 0901, 1101, 1201, 1301, 1501, 1502                                                                      |                           |

HAMSTeRS, Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource; HLA, human leucocyte antigen.

mutations and 383 different positions on the FVIII molecule (Table 2). Approximately 64% (321/500) of the mutations are represented by a single case, 30% (149/500) are represented by 2–10 cases and 6% (30/500) are represented by more than 10 cases. The most represented mutations were R593C (75 cases), R2150H (50 cases), R2159C (40 cases) and R531C (34 cases). In some analysis, the cases were subdivided into three classes of severity (severe/moderate/mild HA) except for 115 cases where this information was unavailable.

### Sequence of wild-type FVIII

The sequence of wild-type human FVIII is available in the FASTA format from different web sites: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA52484.1>, <http://www.uniprot.org/uniprot/P00451>.

### IEDB analysis resource

The 'Immune Epitope Database (IEDB) Analysis Resource' website predicts the binding of peptides with a large number of HLA class II molecules [30]. It provides five different algorithms: NN-align [31], SMM-align [32], combinatorial library, average relative binding – ARB matrix [33], netMHCIIpan [34] and the Sturniolo method [35]; as well as one meta-algorithm: the consensus approach [36]. The consensus is applied whenever the binding can be predicted by three or more methods. The consensus method has been reported to achieve a superior performance in detecting promiscuous MHC class II epitopes as compared to other methods available in the public domain [37]. For some alleles, the consensus method is not applicable due to unavailability of some of the predictors. The strategy recommended by IEDB in this case is to choose from the available methods in the following order of efficiency: consensus > NetMHCIIpan > NN-align > SMM-align > CombLib. The method thus recommended by IEDB for the individual alleles studied, is used in this study. The results are delivered in terms of 'percentile ranks' ranging between 0 and 100, where 0 corresponds to a high binding affinity for a given HLA allele and 100 to a low binding affinity.

The complete sequence of the FVIII molecule (2351 amino acids) was automatically split into 2337 contiguous 15-mer peptides. We selected the 10 HLA class II alleles that include the most common alleles in Europe, among those provided on the IEDB website: HLA DR-B1\*0101, 0301, 0401, 0701, 0901, 1101, 1201, 1301, 1501 and 1502. The prediction output table includes one line for each combination between a 15-mer peptide and 10 HLA alleles (Table 3). The working file thus contained 23 370 predicted percentile ranks (2337 × 10) ranging between 0 and 100.

**Table 2.** Characteristics of the selected cases of missense point mutations from the HAMSTeRS database.

| Factor VIII gene structure |                |                 | HAMSTeRS database ( <a href="http://hadb.org.uk/">http://hadb.org.uk/</a> ) |                                |                             |                      |
|----------------------------|----------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Chains and domains         | Exons (region) | Position of aa* | Number of cases†                                                            | No. of different aa mutations‡ | No. of different locations‡ | % Mutated positions‡ |
| Heavy chain                | 1–14           | 1–741           | 706                                                                         | 263                            | 214                         | 28.92                |
| A1                         | 1–8            | 1–336           | 248                                                                         | 119                            | 101                         | 30.15                |
| a1                         | 8              | 337–372         | 42                                                                          | 9                              | 4                           | 11.43                |
| A2                         | 8–14           | 373–709         | 410                                                                         | 132                            | 106                         | 31.55                |
| a2                         | 14             | 710–741         | 6                                                                           | 3                              | 3                           | 9.68                 |
| Light chain                | 14–26          | 1649–2332       | 750                                                                         | 237                            | 169                         | 24.74                |
| a3                         | 14             | 1649–1689       | 65                                                                          | 7                              | 5                           | 12.50                |
| A3                         | 14–19          | 1690–2019       | 297                                                                         | 124                            | 93                          | 28.27                |
| C1                         | 20–23          | 2020–2172       | 213                                                                         | 56                             | 38                          | 25.00                |
| C2                         | 23–26          | 2173–2332       | 175                                                                         | 50                             | 33                          | 20.75                |
| Full protein               | 1–26           | 1–2332          | 1456                                                                        | 500                            | 383                         | 16.39                |

The B domain has been disregarded from the analysis. HAMSTeRS, Haemophilia A Mutation, Structure, Test and Resource.

\*According to Lenting *et al.* [48].

†For example, in position 282, there are three different amino acids mutations described in the HAMSTeRS database: Arg->Cys (five cases); Arg->His (eight cases); Arg->Leu (four cases). The Arg->Cys cases are filtered out in accordance with the criteria indicated above.

‡Percentage was calculated as: (no. of different locations)/(no. of amino acids) × 100. The number of amino acids in the B domain (1648 – 741 = 907) is not taken into account.

Table 3. Computation of the predicted binding scores (i.e. affinity) for the 2337 first amino acids of wild-type FVIII: example of residue R593.

| Percentile rank according to the IEDB-recommended method | 15-mer sequence         |                     |                     |                     |                     |                     |                       |                     |                     |                     |               |  |  |  |  |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------|--|--|--|--|
|                                                          | Consensus<br>*01:01     | Consensus<br>*03:01 | Consensus<br>*04:01 | Consensus<br>*07:01 | Consensus<br>*09:01 | Consensus<br>*11:01 | NetMHCIIpan<br>*12:01 | Sturniolo<br>*13:01 | Consensus<br>*15:01 | Sturniolo<br>*15:02 | Binding score |  |  |  |  |
| 579                                                      | FDENRSWYLTENIQRF        | 46                  | 19                  | 6.6                 | 2.5                 | 6.2                 | 59                    | 23                  | 11                  | 2.7                 |               |  |  |  |  |
| 580                                                      | DENRSWYLTENIQRF         | 34                  | 17                  | 2.5                 | 12                  | 7.5                 | 39                    | 17                  | 37                  | 2.7                 |               |  |  |  |  |
| 581                                                      | ENRSWYLTENIQRF          | 34                  | 10                  | 7.4                 | 1.1                 | 6.2                 | 24                    | 17                  | 35                  | 2.7                 |               |  |  |  |  |
| 582                                                      | NRSWYLTENIQRF           | 34                  | 8.2                 | 6.3                 | 12                  | 6.2                 | 25                    | 17                  | 38                  | 2.7                 |               |  |  |  |  |
| 583                                                      | RSWYLTENIQRF            | 34                  | 6.5                 | 8.7                 | 13                  | 6.2                 | 23                    | 17                  | 40                  | 2.7                 |               |  |  |  |  |
| 584                                                      | SWYLTENIQRF             | 34                  | 9                   | 11                  | 15                  | 6.2                 | 26                    | 17                  | 47                  | 2.7                 |               |  |  |  |  |
| 585                                                      | WYLTENIQRF              | 25                  | 8.4                 | 1.7                 | 17                  | 5.4                 | 13                    | 1.4                 | 0.7                 | 1                   |               |  |  |  |  |
| 586                                                      | YLTENIQRF               | 21                  | 11                  | 3.6                 | 28                  | 5.4                 | 15                    | 1.4                 | 0.7                 | 1                   |               |  |  |  |  |
| 587                                                      | LTENIQRF                | 12                  | 11                  | 5.3                 | 28                  | 5.4                 | 19                    | 1.4                 | 0.6                 | 1                   |               |  |  |  |  |
| 588                                                      | TENIQRF                 | 7.1                 | 11                  | 3.6                 | 34                  | 3.1                 | 4                     | 1.4                 | 0.6                 | 1                   |               |  |  |  |  |
| 589                                                      | NIQRF                   | 7.1                 | 11                  | 3.6                 | 36                  | 3.1                 | 4.5                   | 1.4                 | 0.7                 | 1                   |               |  |  |  |  |
| 590                                                      | NIQRF                   | 7.1                 | 11                  | 4                   | 42                  | 3.1                 | 5.4                   | 1.4                 | 2.6                 | 1                   |               |  |  |  |  |
| 591                                                      | IQRF                    | 7.1                 | 11                  | 4.6                 | 49                  | 4.3                 | 9.8                   | 1.4                 | 3.2                 | 1                   |               |  |  |  |  |
| 592                                                      | QRF                     | 17                  | 18                  | 18                  | 49                  | 6.7                 | 38                    | 26                  | 39                  | 18                  |               |  |  |  |  |
| 593                                                      | RFP                     | 17                  | 23                  | 45                  | 49                  | 34                  | 49                    | 26                  | 71                  | 18                  |               |  |  |  |  |
|                                                          | Minimum percentile rank | 7.1                 | 6.5                 | 1.7                 | 6.6                 | 3.1                 | 4                     | 1.4                 | 0.6                 | 1                   | 3.29          |  |  |  |  |

In the sequences, the residue subject to mutation is in bold. In the table, the minimum score for each allele is in bold.

### Statistical analysis

Analysis of the data included the three following factors: severity of HA in three classes, location of the mutations on the FVIII heavy (without the B domain) or light chains and location of the mutations on the FVIII domains (A1, A2, A3, C1, C2 and a1, a2, a3 regions pooled together). Ultimately, the goal was to study the correlation between inhibitor elicitation (Table 4) and predicted promiscuity of the peptides of wild-type exogenous FVIII that correspond to the mutated peptides of the endogenous FVIII of each patient in the HAMSTeRS database. Each point mutation causes changes to fifteen 15-mer frames (e.g. Table 3 in the case of R593). For each allele, only the most probable epitope among the affected 15-mer peptides (with the minimum percentile rank) was considered. The immunogenicity was predicted by taking the mean of these minima across the 10 alleles. This synthetic criterion is referred to as a 'binding score' (Table 3). The 'binding score' thus represents the mean predicted affinity of a peptide towards 10 HLA-DR alleles, which may also be referred to as the 'binding promiscuity' of the peptide.

Logistic regressions were performed using the Stata software (version 12, StataCorp LP, College Station, TX, USA), wherein informative cases in the HAMSTeRS database represented statistical units, the dependent variable was the inhibitory status and the independent variables were the severity of HA (in three classes), the position (chain and domain) of the mutation and the 'binding score' (automatically split into three tertiles by the software). This study had been performed using the HAMSTeRS database available in October–November 2011. It was repeated for the sake of the present study using the latest

Table 4. Proportion of FVIII inhibitors according to the severity of haemophilia A and to the position of the missense mutations.

|              | No inhibitor | Inhibitor | % <sup>†</sup> | 95% CI     | P      |
|--------------|--------------|-----------|----------------|------------|--------|
| Severity*    |              |           |                |            | 0.163  |
| Mild         | 773          | 49        | 5.96           | 4.44–7.8   |        |
| Moderate     | 376          | 33        | 8.07           | 5.62–11.14 |        |
| Severe       | 99           | 11        | 10             | 5.1–17.19  |        |
| Domain       |              |           |                |            | <0.001 |
| A1           | 243          | 5         | 2.02           | 0.66–4.64  |        |
| A2           | 379          | 32        | 7.79           | 5.38–10.81 |        |
| A3           | 283          | 14        | 4.71           | 2.60–7.78  |        |
| C1           | 191          | 22        | 10.33          | 6.59–15.22 |        |
| C2           | 154          | 21        | 12.00          | 7.58–17.76 |        |
| a1, a2, a3   | 111          | 1         | 0.89           | 0.02–4.87  |        |
| Chain        |              |           |                |            | 0.087  |
| Heavy        | 668          | 38        | 5.38           | 3.84–7.31  |        |
| Light        | 693          | 57        | 7.6            | 5.81–9.731 |        |
| All patients | 1361         | 95        | 6.52           | 5.31–7.92  |        |

The significant P value is in bold.

\*29 missing values.

<sup>†</sup>Calculated as: (no. of 'inhibitor' cases)/(no. of 'no inhibitor' cases + no. of 'inhibitor' cases) × 100.

update (December 2012). Both analyses yielded identical results.

## Results

### *Distribution of missense mutations of the FVIII molecule*

We first screened the HAMSTeRS database for patients with point mutations. We selected cases where missense mutations in coding sequences were associated with the detection of FVIII:Ag and FVIII:C (CRM-positive patients) and where the inhibitory status of the patients was reported (Table 1). Our selection criteria identified 1456 eligible cases of missense mutations in the A1a1A2a2 and a3C1C2 domains of FVIII, that accounted for 383 locations of mutated amino acids on FVIII and 500 different amino acid replacements (Table 2). The low number of reported missense mutations in the 907 amino acid-long B domain of the molecule reflects the fact that this domain does not play a role in the activity of FVIII. For this reason, the B domain was not included in the analysis. Previous reports have ascribed approximately half of the point mutations in the F8 gene (53%) to the heavy chain of the FVIII molecule [2]. Using our selection criteria, a similar percentage of missense mutations in the F8 gene (54%) was located in the A1 and A2 domains. The selected missense mutations affected to a greater extent the A1, A2 and A3 domains ( $30.0 \pm 1.6\%$ ) than the C1 and C2 domains following correction for the length of each domain ( $22.9 \pm 3.0\%$ ,  $P = 0.038$ ).

### *Factors associated with the presence of inhibitors in the HAMSTeRS database*

The presence of an inhibitor was reported in 6.52% of patients with missense mutations (95% CI: 5.31–7.92%) (Table 4). The severity of HA among patients with missense mutations was not significantly associated with the presence of an inhibitor ( $P = 0.163$ ). In contrast, the frequency of inhibitor development was statistically significantly associated with the location of the mutations on the A1 (2.02%), A2 (7.79%), A3 (4.71%), a1a2a3 (0.89%), C1 (10.33%) and C2 (12%) domains ( $P < 0.001$ ). It was, however, not associated with the location of the mutations on the light or heavy chains of FVIII ( $P = 0.087$ ).

### *Association between the predicted binding score and the presence of inhibitors*

A binding score was predicted for each of the wild-type FVIII peptides that corresponded to the mutated peptides selected from the HAMSTeRS database. An example is provided in Table 3 in the case of R593. The percentile rank of each of the 15-mer peptides that encompass R593 was predicted using IEDB for each of the 10 HLA-DR alleles included in the analysis, thus generating a  $15 \times 10$  matrix. For each of the HLA-DR, the minimum percentile rank for the fifteen 15-mer peptides was selected (Table 3). We then calculated the mean, on the 10 HLA-DR alleles, of the 10 minimum percentile ranks which is referred to as 'binding score' (Table 3). A binding score was generated for each of the wild-type peptides that corresponded to a missense mutation reported in the HAMSTeRS database. The binding score of each peptide, that represents the mean predicted affinity, or promiscuity towards the 10 HLA-DR alleles, was then associated with the inhibitor-positive or inhibitor-negative status of the corresponding mutations, as reported in HAMSTeRS.

The binding score of the peptides for the 10 HLA class II alleles was significantly associated with the presence of an inhibitor (Table 5). Thus, the mean binding score was 10.01 [9.54–10.48] in the case of inhibitor-negative cases, and 7.36 [6.32–8.40] in the case of inhibitor-positive cases ( $P = 0.002$ ). Importantly, the significant association persisted following adjustment for the severity of HA ( $P = 0.002$ ) and adjustment for the chain of FVIII carrying the HA-causing missense mutation ( $P = 0.004$ ). In contrast, the significant association was lost following adjustment on the nature of the domains carrying the mutation.

The binding scores were then transformed into a categorical variable by splitting them automatically into tertiles. In agreement with the results of Table 5, the proportion of inhibitors was significantly greater when mutations were in peptides with the lowest binding scores/highest predicted mean affinity ( $P = 0.006$ , Table 6). Bivariate analyses of the proportion of inhibitors depending on severity, on location on the individual domains of FVIII, or on location on the heavy/light chain of FVIII yielded  $P$  values of 0.168,  $<0.001$  and 0.086 respectively (in agreement with Table 4). The associations between the proportion of inhibitors and the binding scores were still statistically significant in multivariate analysis following adjustment for the

**Table 5.** Association between the predicted binding scores and the presence of an inhibitor.

|               | No inhibitor $n = 795$ |            | Inhibitor $n = 59$ |           | Not adjusted |              | Adjusted on  |        |              |
|---------------|------------------------|------------|--------------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------|--------------|
|               | Mean                   | 95% CI     | Mean               | 95% CI    | $t$ -test    | KW*          | Severity     | Domain | Chain        |
| Binding score | 10.01                  | 9.54–10.48 | 7.36               | 6.32–8.40 | <b>0.002</b> | <b>0.005</b> | <b>0.002</b> | 0.091  | <b>0.004</b> |

The significant  $P$  values are in bold.

\*Kruskal–Wallis rank test.

severity of HA and for the chain carrying the mutation ( $P = 0.0013$ ). In contrast, the statistical significance was lost in the multivariate analysis following adjustment on the individual domains (Table 6,  $P = 0.113$ ). We thus went more into the detail of the importance of the respective domains in the analysis.

We considered separately the importance of the pooled A1, A2, A3 and C1 domains vs. that of the C2 domain. The analysis on the A1, A2, A3 and C1 domains yielded a statistically significant association between the inhibitor-positive status of a mutated peptide and the binding score of the corresponding wild-type FVIII peptide (Table 7,  $P = 0.002$  respectively). Likewise, the analysis on the C2 domain alone showed a significant association between the predicted binding score and the inhibitory status associated with each peptide ( $P = 0.03$ ). However, while the association matched our initial hypothesis of lower binding scores/higher predicted mean affinity for the peptides corresponding to inhibitor-associated mutations in the case of the C1 and A family domains (OR = 0.29 [0.14–0.60] for the low predicted mean affinity/high binding score tertile), the OR in the case of the C2 domain showed an inverse correlation between the binding score and the inhibitory status: OR = 3.56 [1.10–11.52] for the low predicted mean affinity/high binding score tertile. The results suggest that wild-type FVIII peptides corresponding to mutated peptides on the C2 domain do not bind with a high affinity the entire set

**Table 7.** Effects of the predicted binding scores and domain of the mis-sense mutation on inhibitor incidence.

| Binding score         | No inhibitor | Inhibitor |       | Bivariate analysis |            |          |
|-----------------------|--------------|-----------|-------|--------------------|------------|----------|
|                       | <i>n</i>     | <i>n</i>  | %     | OR                 | 95% CI     | <i>P</i> |
| No C2 mutation group* |              |           |       |                    |            |          |
| Low (high affinity)   | 384          | 42        | 9.86  | 1                  |            | 0.002    |
| Intermediate          | 406          | 22        | 5.14  | 0.58               | 0.34–1.01  |          |
| High (low affinity)   | 417          | 10        | 2.34  | <b>0.29</b>        | 0.14–0.60  |          |
| C2 mutation group     |              |           |       |                    |            |          |
| Low (high affinity)   | 55           | 4         | 6.78  | 1                  |            | 0.03     |
| Intermediate          | 45           | 3         | 6.25  | 0.92               | 0.19–4.31  |          |
| High (low affinity)   | 54           | 14        | 20.59 | <b>3.56</b>        | 1.10–11.52 |          |
| All patients          | 1361         | 95        |       |                    |            |          |

The significant *P* values are in bold.

\*A1, A2, A3, C1, C2 and a1, a2 and a3 pooled together.

of HLA-DR alleles included in the analysis, and exhibit a low degree of promiscuity. Thus, in contrast to epitopes in the rest of the molecule, C2 domain mutations associated with the highest risk for inhibitor induction fall in epitopes with lower promiscuity.

## Discussion

The present data show that the predicted mean affinity of FVIII-derived peptides for several class II HLA alleles is associated with the occurrence of FVIII

**Table 6.** Proportion of FVIII inhibitors according to the predicted binding scores.

|                            | No inhibitor | Inhibitor |       | Bivariate analysis |            |          | Multivariate analysis |            |          |
|----------------------------|--------------|-----------|-------|--------------------|------------|----------|-----------------------|------------|----------|
|                            | <i>n</i>     | <i>n</i>  | %     | OR                 | 95% CI     | <i>P</i> | aOR                   | 95% CI     | <i>P</i> |
| Binding score <sup>†</sup> |              |           |       |                    |            |          |                       |            |          |
| Low (high affinity)        | 439          | 46        | 9.48  | 1                  |            | 0.006    | 1                     |            | 0.0013   |
| Intermediate               | 451          | 25        | 5.25  | 0.53               | 0.32–0.88  |          | 0.48                  | 0.28–0.81  |          |
| High (low affinity)        | 471          | 24        | 4.85  | 0.49               | 0.29–0.81  |          | 0.43                  | 0.26–0.72  |          |
| Binding score <sup>‡</sup> |              |           |       |                    |            |          |                       |            |          |
| Low (high affinity)        |              |           |       |                    |            |          | 1                     |            | 0.113    |
| Intermediate               |              |           |       |                    |            |          | 0.63                  | 0.37–1.05  |          |
| High (low affinity)        |              |           |       |                    |            |          | 0.62                  | 0.36–1.07  |          |
| Severity* <sup>§</sup>     |              |           |       |                    |            |          |                       |            |          |
| Mild                       | 773          | 49        | 5.96  | 1                  |            | 0.168    | 1                     |            | 0.208    |
| Moderate                   | 376          | 33        | 8.07  | 1.39               | 0.88–2.19  |          | 1.33                  | 0.84–2.12  |          |
| Severe                     | 99           | 11        | 10    | 1.6                | 0.88–3.48  |          | 1.73                  | 0.87–3.44  |          |
| Domain <sup>§</sup>        |              |           |       |                    |            |          |                       |            |          |
| A1                         | 243          | 5         | 2.02  | 1                  |            | <0.001   | 1                     |            | <0.001   |
| A2                         | 379          | 32        | 7.79  | 4.1                | 1.58–10.68 |          | 4.52                  | 1.73–11.81 |          |
| A3                         | 283          | 14        | 4.71  | 2.4                | 0.85–6.77  |          | 2.45                  | 0.87–6.93  |          |
| C1                         | 191          | 22        | 10.33 | 5.6                | 2.08–15.06 |          | 5.56                  | 2.04–15.12 |          |
| C2                         | 154          | 21        | 12    | 6.63               | 2.45–17.94 |          | 7.15                  | 2.63–19.44 |          |
| a1, a2, and a3             | 111          | 1         | 0.89  | 0.44               | 0.05–3.79  |          | 0.44                  | 0.05–3.84  |          |
| Chain <sup>§</sup>         |              |           |       |                    |            |          |                       |            |          |
| Heavy                      | 668          | 38        | 5.38  | 1                  |            | 0.086    | 1                     |            | 0.138    |
| Light                      | 693          | 57        | 7.6   | 1.44               | 0.95–2.21  |          | 1.39                  | 0.90–2.13  |          |
| All patients               | 1361         | 95        |       |                    |            |          |                       |            |          |

The significant *P* values are in bold.

\*115 missing values.

<sup>†</sup>Adjusted on severity and chain (for multivariate analysis).

<sup>‡</sup>Adjusted on chain (for multivariate analysis).

<sup>§</sup>Adjusted on severity (for multivariate analysis).

<sup>¶</sup>Adjusted on all individual domain: A1, A2, A3, C1, C2 and a1, a2 and a3 pooled together (for multivariate analysis).

inhibitors in HA patients with missense mutations. Because of the size of the FVIII molecule, it was impossible to confirm the *in silico* prediction using binding assays [38]. Importantly, the predicting power of the IEDB consensus method has been validated earlier by comparison with real binding data, categorized relative to a given affinity threshold. Thus, the area under the receiver operating characteristic curve plotted for an affinity threshold of 1  $\mu\text{M}$  was  $\sim 0.8$  [36,39]. Of note, all peptides found to bind HLA alleles *in vitro* do not necessarily induce T-cell responses *in vivo* [36].

To specifically study the influence of each missense mutation on the risk to develop FVIII inhibitors, and to minimize the heterogeneity that could be generated by the inclusion of cases in which truncated FVIII molecules are produced in the patients or may be presented in the thymus during T-cell ontogeny, we excluded from the analysis the missense mutations that were associated with the absence of production of full FVIII. Our analysis thus focused on 383 different mutated amino acids that were associated with 500 different types of mutations, corresponding to 1456 described cases (Table 2). Importantly, using the selected cases, the distribution of missense mutations on the different domains of FVIII molecules and the distribution of the inhibitor-associated mutations are essentially similar to that reported previously [19,40]. Furthermore, our analysis indicates that, in a population of patients with missense mutations, and in contrast to analyses that include the whole population of HA patients [2], the inhibitory status of the studied cases is not associated with the severity of HA. This is probably due to the fact that the patients included in our analysis are all CRM positive, irrespective of the residual FVIII activity measured in their plasma, and, hence, that their immune system has been educated towards the endogenous mutated FVIII. Our analysis also indicates that the inhibitory status of the studied cases is not associated with a preferential location of the mutations on the heavy or light chain of FVIII [2].

In line with our working hypothesis, our results document a statistically significant association between the predicted mean affinity (promiscuity) of wild-type FVIII peptides for HLA and the inhibitory status of each corresponding mutated peptide included in the analysis. It is noteworthy that the very HLA haplotype of each of the patients listed in the HAMSTERS database is not available. Thus, our approach merely artificially links *in silico* predicted affinities for HLA class II alleles, of peptides obtained using the published sequence of wild-type FVIII, with empirical clinical data on FVIII mutations and inhibitory status. Hence, the demonstration of a statistically significant association pleads in favour of an important role of peptide/HLA interactions and of the associated shaping of T-cell repertoires, in providing tolerance to exogenous FVIII in HA patients. Our results pave the way towards

a confirmation of the predictive value of the mean affinity (i.e. promiscuity) of wild-type FVIII-derived peptides on inhibitor development with respect to each individuals HLA haplotype, in a clinical study wherein the immune status of CRM-positive patients, the HA-causing missense mutation and the HLA-DR haplotype are identified and matched to the *in silico* predicted affinity of the corresponding wild-type peptide.

Although such an association had been suggested *in silico* by previous studies [41,42], this study highlights the fact that statistical significance is lost following adjustment of the multivariate analysis on the domains on which the mutations are located. In line with our hypothesis, the analysis including only mutations located on the A1, A2, A3 and C1 domains yielded a statistically significant association between a positive inhibitory status of the mutated peptides and lower binding scores/higher predicted mean affinities of the corresponding wild-type peptides for HLA class II. Conversely, the analysis performed on the mutations located in the C2 domain alone indicated that the positive inhibitory status of the mutated peptides was found more frequently in wild-type peptides with lower level of promiscuity for HLA class II alleles.

Our analysis of a mean affinity (binding score) across 10 different HLA class II alleles emphasizes the presence of promiscuous or immuno-dominant T-cell epitopes in the FVIII molecule. van Haren *et al.* have isolated FVIII-derived peptides from the monocyte-derived dendritic cells of four healthy blood donors with HLA haplotypes that match the alleles included in this study [43]. The identified peptides originated from all domains of the FVIII molecule. In contrast to these findings, a recent study by Steinitz *et al.* documented the presence of immuno-dominant peptides in all domains of the FVIII molecules with the exception of the C2 domain [44]. Thus, the latter group was able to generate CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas from E17 HLA-DRB1\*1501 transgenic FVIII-deficient mice that proliferated against peptides from the A1, A2, B, A3 and C1 domains. However, although immunization with FVIII yielded anti-C2 antibodies, none of the T-cell hybridomas reacted to epitopes in the C2 domain. The discrepancy in the results we have obtained with wild-type peptides corresponding to mutated peptides on C2 and wild-type peptides corresponding to mutations located on the rest of the molecule is in line with the above findings. It further suggests that the multiple factors defining immunogenicity do not affect equally the different domains of the FVIII molecule. Importantly, a high binding score/low predicted mean affinity for multiple alleles does not mean that the peptide is not a good epitope for some isolated HLA alleles. Indeed, all mutation sites on the C2 domain were found to correspond to at least one wild-type peptide with a very favourable binding score/high affinity for a particular allele (data not shown). For instance, the W2229C

mutations occur in a region that is predicted to bind with high affinity to only two HLA-DR alleles (DRB1\*0301 and DRB1\*1101), but are associated with an inhibitor-positive status in 32% of the cases. Besides, multiple 'high risk' F8 genotypes have been located in the C2 domain of FVIII: W2229C, P2300L, and N2286K [18,45]. It remains to be elucidated, however, whether the elevated hydrophobicity of the C2 domain as compared to the other domains of the molecule [46], or the role of the C2 domain in binding to von Willebrand factor [47] or to phospholipids on activated membranes, account for the observed differences.

## Acknowledgements

This study 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, Partenariats Hubert Curien (Programme

RILA 2011, 25250XM), Agence Nationale de la Recherche (ANR-07-MRAR-028-01), a grant from CSL-Behring S.A. (Paris, France) and the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement no. (115303), the resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' in kind contribution (for further information, please refer to [www.abirisk.eu](http://www.abirisk.eu)). LG was the recipient of a Poste d'accueil INSERM (INSERM, Paris, France).

## Author contribution

ADP, TC, SVK and SLD designed the research and wrote the paper. ADP, TC, LG, YR and SLD performed the research. ADP, TC, LG, BM, JO, AP and SLD analysed the data.

## Disclosures

The authors stated that they had no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

## References

- Mannucci PM, Tuddenham EG. The hemophilias—from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001; **344**: 1773–9.
- Graw J, Brackmann HH, Oldenburg J, Schneppenheim R, Spannagl M, Schwaab R. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 488–501.
- Ehrenforth S, Kreuz W, Scharer I *et al.* Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet* 1992; **339**: 594–8.
- Gringeri A, Mantovani LG, Scalone L, Mannucci PM. Cost of care and quality of life for patients with hemophilia complicated by inhibitors: the COCIS Study Group. *Blood* 2003; **102**: 2358–63.
- Algiman M, Dietrich G, Nydegger U, Boieldieu D, Sultan Y, Kazatchkine MD. Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3795–9.
- Moreau A, Lacroix-Desmazes S, Stieltjes N *et al.* Antibodies to the FVIII light chain that neutralize FVIII procoagulant activity, are present in the plasma of non-responder patients with severe hemophilia A and healthy blood donors. *Blood* 2000; **95**: 3435–41.
- Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Anderson TA, Conti-Fine BM. Human CD4<sup>+</sup> T-cell epitope repertoire on the C2 domain of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost* 2003; **1**: 1777–84.
- Reding MT, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Anderson TA, Conti-Fine BM. Epitope repertoire of human CD4<sup>+</sup> T cells on the A3 domain of coagulation factor VIII. *J Thromb Haemost* 2004; **2**: 1385–94.
- Reding MT, Wu H, Krampf M *et al.* CD4<sup>+</sup> T cell response to factor VIII in hemophilia A, acquired hemophilia, and healthy subjects. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 509–15.
- Rossi F, Dietrich G, Kazatchkine MD. Anti-idiotypes against autoantibodies in normal immunoglobulins: evidence for network regulation of human autoimmune responses. *Immunol Rev* 1989; **110**: 135–49.
- Rossi F, Sultan Y, Kazatchkine MD. Anti-idiotypes against autoantibodies and alloantibodies to factor VIII:C (anti-hemophilic factor) are present in therapeutic polyspecific normal immunoglobulins. *Clin Exp Immunol* 1988; **74**: 311–6.
- Kamate C, Lenting PJ, van den Berg HM, Mutis T. Depletion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells may enhance or uncover factor VIII-specific T cell responses in healthy individuals. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 611–3.
- Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, Andre S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood* 2008; **112**: 240–9.
- Collins PW, Hirsch S, Baglin TP *et al.* Acquired hemophilia A in the United Kingdom: a 2-year national surveillance study by the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Blood* 2007; **109**: 1870–7.
- Gouw SC, van den Berg HM, Oldenburg J *et al.* F8 gene mutation type and inhibitor development in patients with severe hemophilia A: a systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012; **119**: 2922–34.
- Schwaab R, Brackmann H-H, Meyer C *et al.* Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* 1995; **74**: 1402–6.
- Viel KR, Ameri A, Abshire TC *et al.* Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1618–27.
- Schwarz J, Astermark J, Menius ED *et al.* F8 haplotype and inhibitor risk: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Haemophilia* 2013; **19**: 113–8.
- Oldenburg J, El-Maarri O. New insight into the molecular basis of hemophilia A. *Int J Hematol* 2006; **83**: 96–102.
- Astermark J, Oldenburg J, Carlson J *et al.* Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; **108**: 3739–45.
- Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Bernthorpe E, Lefvert AK. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1beta and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006; **107**: 3167–72.
- Astermark J, Wang X, Oldenburg J, Bernthorpe E, Lefvert AK. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and inhibitor development in patients with severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2007; **5**: 263–5.
- Pavlova A, Delev D, Lacroix-Desmazes S *et al.* Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 2006–15.
- Oldenburg J, Picard JK, Schwaab R, Brackmann HH, Tuddenham EG, Simpson E. HLA genotype of patients with severe hemophilia A due to intron 22 inversion with and without inhibitors of factor VIII. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 238–42.
- Hay CR, Ollier W, Pepper L *et al.* HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe hemophilia A. UKHCDO Inhibitor Working Party. *Thromb Haemost* 1997; **77**: 234–7.
- Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED *et al.* The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood* 2013; **121**: 1446–54.
- Eckhardt CL, Menke LA, van Ommen CH *et al.* Intensive peri-operative use of factor VIII and the Arg593→Cys mutation are risk factors for inhibitor development in mild/moderate hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2009; **7**: 930–7.
- Bril WS, MacLean PE, Kaijen PH *et al.* HLA class II genotype and factor VIII inhibitors in mild hemophilia A patients

- with an Arg593 to Cys mutation. *Haemophilia* 2004; **10**: 509–14.
- 29 Kembell-Cook G, Tuddenham EG, Wacey AI. The factor VIII structure and mutation resource site: HAMSTeRS version 4. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 216–9.
  - 30 Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA *et al.* The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: D854–62.
  - 31 Nielsen M, Lund O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics* 2009; **10**: 296.
  - 32 Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T *et al.* NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence. *PLoS ONE* 2007; **2**: e796.
  - 33 Bui HH, Sidney J, Peters B *et al.* Automated generation and evaluation of specific MHC binding predictive tools: ARB matrix applications. *Immunogenetics* 2005; **57**: 304–14.
  - 34 Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T *et al.* Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan. *PLoS Comput Biol* 2008; **4**: e1000107.
  - 35 Sturniolo T, Bono E, Ding J *et al.* Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 555–61.
  - 36 Wang P, Sidney J, Dow C, Mothe B, Sette A, Peters B. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol* 2008; **4**: e1000048.
  - 37 Lin HH, Zhang GL, Tongchusak S, Reinherz EL, Brusic V. Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. *BMC Bioinformatics* 2008; **9**(Suppl. 12): S22.
  - 38 Delluc S, Ravot G, Maillere B. Quantification of the preexisting CD4 T-cell repertoire specific for human erythropoietin reveals its immunogenicity potential. *Blood* 2010; **116**: 4542–5.
  - 39 Wang P, Sidney J, Kim Y *et al.* Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics* 2010; **11**: 568.
  - 40 Green PM, Bagnall RD, Waseem NH, Giannelli F. Haemophilia A mutations in the UK: results of screening one-third of the population. *Br J Haematol* 2008; **143**: 115–28.
  - 41 Yanover C, Jain N, Pierce G, Howard TE, Sauna ZE. Pharmacogenetics and the immunogenicity of protein therapeutics. *Nat Biotechnol* 2011; **29**: 870–3.
  - 42 Pashov AD, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Missense Mutations Disrupting Promiscuous Class II Self-Epitopes are Associated with Development of Inhibitory Antibodies to Factor VIII. Philadelphia, PA: Immunogenicity Summit, 2010.
  - 43 van Haren SD, Herczenik E, ten Brinke A, Mertens K, Voorberg J, Meijer AB. HLA-DR-presented peptide repertoires derived from human monocyte-derived dendritic cells pulsed with blood coagulation factor VIII. *Mol Cell Proteomics* 2011; **10**: M110.002246. doi: 10.1016/j.blre.2011.10.001.
  - 44 Steinitz KN, van Helden PM, Binder B *et al.* CD4<sup>+</sup> T-cell epitopes associated with antibody responses after intravenously and subcutaneously applied human FVIII in humanized hemophilic E17 HLA-DRB1\*1501 mice. *Blood* 2012; **119**: 4073–82.
  - 45 Astermark J, Donfield SM, Gomperts ED *et al.* The polygenic nature of inhibitors in hemophilia A: results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort. *Blood* 2013; **121**: 1446–54.
  - 46 Dimitrov JD, Roumenina LT, Plantier JL *et al.* A human FVIII inhibitor modulates FVIII surface electrostatics at a VWF-binding site distant from its epitope. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 1524–31.
  - 47 Vlot AJ, Koppelman SJ, Meijers JCM *et al.* Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association. *Blood* 1996; **87**: 1809–16.
  - 48 Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* 1998; **92**: 3983–96.

## **Letter to the Editor Blood**

### **In silico prediction of immuno-dominant T-cell epitopes on human therapeutic factor VIII**

Short title: **In silico prediction of factor VIII epitopes**

Laurent Gilardin<sup>1,2,3,4</sup>, Anastas Pashov<sup>1,2,3,5</sup>, Bernard Maillère<sup>6</sup>, Sandrine Delignat<sup>1,2,3</sup>, Paul Coppo<sup>4,7</sup>, Srinivas V Kaveri<sup>1,2,3,8</sup>, Sébastien Lacroix-Desmazes<sup>1,2,3,8</sup> on behalf of the ABIRISK consortium

<sup>1</sup>INSERM, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006 France; <sup>2</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006 France; <sup>3</sup>Université Paris Descartes, UMR S 872, Les Cordeliers, Paris, F-75006 France; <sup>4</sup>Centre de référence des microangiopathies thrombotiques, Paris, France; <sup>5</sup>Department of immunology, Bulgarian Academy of Science, Sofia, Bulgaria; <sup>6</sup>Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institute of Biology and Technologies, Service d'ingénierie moléculaire des protéines (SIMOPRO), Gif-sur-Yvette, France; <sup>7</sup>Département d'hématologie, UPMC Université Paris 6, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, F-75012 France; <sup>8</sup>International 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](mailto:sebastien.lacroix-desmazes@crc.jussieu.fr)

Word count : 300

Figure: 1

References: 5

Steinitz *et al.*<sup>1</sup> recently identified 8 regions of full-length human factor VIII (FVIII) as containing immunodominant T-cell epitopes restricted by HLA-DRB1\*1501: FVIII-deficient HLA-DRB1\*1501 transgenic mice were immunized with FVIII, CD4<sup>+</sup> T-cell hybridomas were generated and used to screen 15-mer peptides shifted by 3 amino-acids spanning the whole FVIII molecule.

This exhaustive study provides a platform to evaluate *in silico* modeling of T-cell epitopes in the case of FVIII, a well-studied immunogenic protein therapeutic<sup>2</sup>. Indeed, *in silico* modeling has been developed to predict the binding affinity of peptides for different HLA haplotypes, allowing anticipation of immunodominant epitopes. However, the most common freely accessible epitope database, IEDB<sup>3</sup>, has been implemented using HLA binding data from pathogen-derived peptides<sup>4</sup> and predictions have only been validated for foreign antigens<sup>5</sup>.

We applied the “consensus” prediction method of IEDB to the entire range of FVIII-derived 15-mer peptides shifted by one amino-acid for binding to HLA-DRB1\*1501 to identify immuno-dominant regions on FVIII. *In silico* predicted regions were then compared to the “hybridoma-selected” regions<sup>1</sup>. The ROC curve indicates that the IEDB tool is a reliable predictor of immuno-dominant peptides (AUC=0.90±0.05, Figure 1A). Interestingly, a binding score below 3 was the minimal threshold allowing the retrieval of all the immuno-dominant T-cell epitopes identified by Steinitz *et al.* Thus, with a score of 3, IEDB predicted 108 peptides of the 2318 tested peptides as T-cell epitopes. These 108 peptides encompassed 20 regions of 15 to 26 amino-acids on the FVIII molecule that included the 8 immuno-dominant regions also identified by Steinitz *et al.* (i.e., 59 15-mer peptides, Figure 1B). Although *in silico* predicted T-cell epitopes require systematic *in vitro* validation by direct binding to HLA molecules and stimulation of primed CD4<sup>+</sup> T cells, prediction tools constitute a rapid, reliable and cost-effective alternative to investigate T-cell epitopes on proteins for replacement therapy.

**Acknowledgements.**

This work was supported by INSERM, by CNRS, by UPMC-Paris6 and by the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement n° [115303], resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) and EFPIA companies' in kind contribution. LG was a recipient of a fellowship from the Société Nationale Française de Médecine Interne.

Authors' contribution.

Designed research : LG, AP, BM, SLD

Performed research : LG, AP

Analysed data : LG, AP, BM, SD, PC, SVK, SLD

Wrote paper : LG, SLD

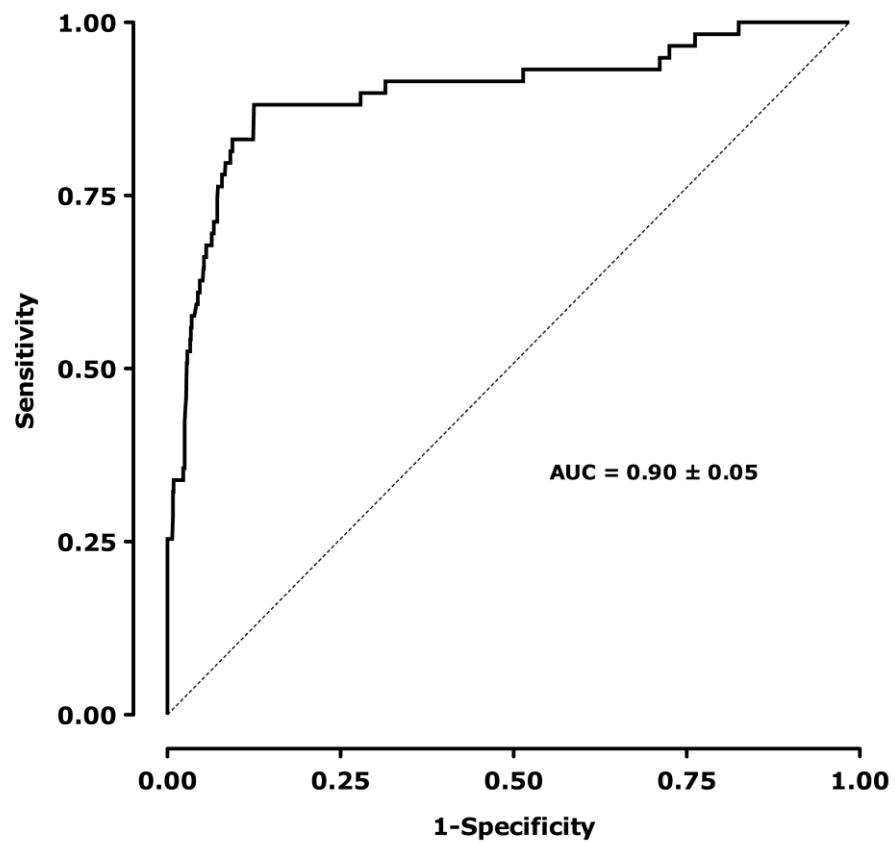
The authors do not have any conflict of interest

## References

1. Steinitz KN, van Helden PM, Binder B, et al. CD4+ T-cell epitopes associated with antibody responses after intravenously and subcutaneously applied human FVIII in humanized hemophilic E17 HLA-DRB1\*1501 mice. *Blood*. 2012;119(17):4073-4082.
2. Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, Andre S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood*. 2008;112(2):240-249.
3. Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, et al. The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Database issue):D854-862.
4. Sette A, Fleri W, Peters B, Sathiamurthy M, Bui HH, Wilson S. A roadmap for the immunomics of category A-C pathogens. *Immunity*. 2005;22(2):155-161.
5. Kim Y, Sette A, Peters B. Applications for T-cell epitope queries and tools in the Immune Epitope Database and Analysis Resource. *J Immunol Methods*. 2010;374(1-2):62-69.

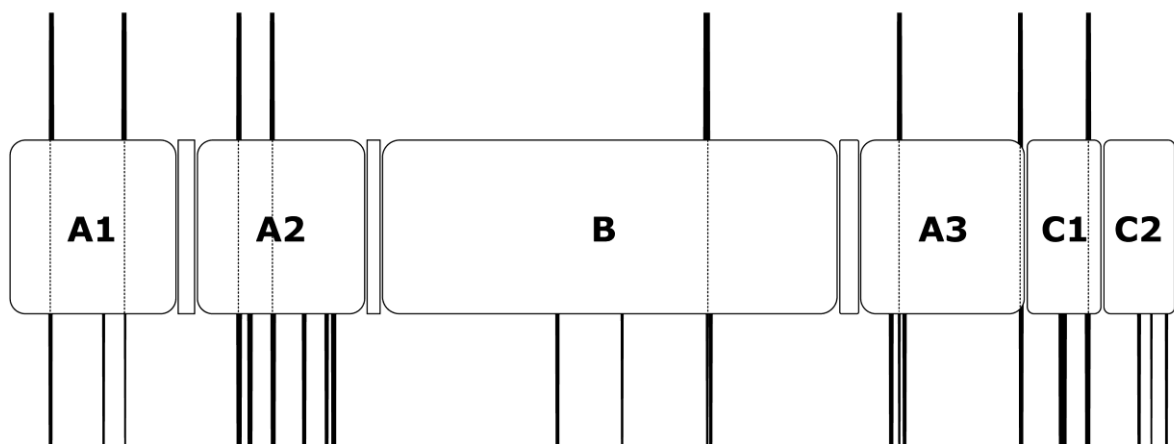
**Figure 1. Prediction of T-cell immunodominant epitopes on human FVIII. Panel A. ROC curve for the prediction of FVIII-derived T-cell epitopes using IEDB.** The complete sequence of the mature FVIII molecule (2332 amino-acids) was automatically split into 2318 15-mer peptides shifted by 1 amino-acid. The binding scores of the 15-mer peptides to the HLA-DRB1\*1501 haplotype were predicted on the IEDB Analysis Resource website ([www.immuneepitope.org/](http://www.immuneepitope.org/)) using the consensus algorithm. In the prediction, lower scores are predictive of higher probability for a peptide to bind the tested HLA molecule. In parallel, we predicted the binding scores of the 59 15-mer peptides (shifted by 1 amino-acid) derived from the 8 immuno-dominant regions characterized by “hybridoma screening”<sup>1</sup>. The graph depicts the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve, wherein the binding scores of the 2318 peptides were compared to that of the 59 peptides identified by “hybridoma screening”. AUC represents the area under the curve (mean±SEM). **Panel B. Comparative location of the immunodominant regions of human FVIII as identified by “hybridoma screening” and as predicted *in silico*.** The panel depicts the different domains of the FVIII molecule: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. Vertical bars above the FVIII structure indicate the location of FVIII regions with immuno-dominant T-cell epitopes as determined by “hybridoma screening”. Vertical bars below the FVIII structure indicate the location of FVIII regions with immuno-dominant T-cell epitopes as predicted by IEDB using a threshold of the binding score below 3.

**A**



**B**

**Immunodominant regions identified by  
hybridoma screening**



**Immunodominant regions predicted *in silico***

ORIGINAL ARTICLE *Clinical haemophilia*Predictive immunogenicity of Refacto<sup>®</sup> AF

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

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

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

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

**Keywords:** factor VIII, haemophilia A, immunogenicity, inhibitors, prediction, refacto<sup>®</sup> AF

## Introduction

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

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

Correspondence: Sébastien Lacroix-Desmazes, INSERM UMR 872 Equipe 16, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France.

Tel.: +33 1 44 27 82 02; fax: +33 1 44 27 81 94;  
e-mail: Sebastien.Lacroix-Desmazes@crc.jussieu.fr

Accepted after revision 21 November 2013

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

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

## Materials and methods

### *Preparation of FVIII from therapeutic concentrates*

Different commercially available therapeutic FVIII products were analysed: two full-length recombinant FVIII (second-generation product Helixate®, CSL-Behring, Marburg, Germany, and third-generation product Advate®, Baxter Bioscience, Maurepas, France), and one recombinant B domain-deleted FVIII (third-generation product ReFacto® AF, Pfizer, Paris, France). The different FVIII were solubilized in their respective excipients and dialyzed against RPMI or HEPES 10 mM in the presence of 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> for 3 h at 4 °C. FVIII:Ag and FVIII:C were quantified using an Asserachrom® kit (Stago, Asnières sur Seine, France) and a chromogenic assay (Dade-Behring, Marburg, Germany), respectively, using human plasma as standard. All concentrations indicated are based on the FVIII:Ag values.

### *CD206 ELISA*

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

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

### *Preparation of immature monocyte-derived dendritic cells*

Monocytes from peripheral blood mononuclear cells were isolated using anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) from heparinized buffy coats of healthy donors in RPMI-1640 medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum, L-glutamine and antibiotics. Adherent monocytes were cultured in X-VIVO<sup>15</sup> medium supplemented with 1% human AB serum, in the presence of 500 IU human recombinant IL-4 (R&D Systems, Lille, France) and 1000 IU human recombinant GM-CSF (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) per 10<sup>6</sup> cells. After 5 days of culture, the non-adherent immature monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs)-enriched fraction was harvested and the immature status was confirmed by the expression of the following surface phenotypic markers: CD40, CD80, CD86, CD83, CD1a and HLA DR, as explained previously [18].

### *FVIII endocytosis by monocyte-derived dendritic cells*

Immature MO-DCs (4 × 10<sup>5</sup> cells/well) were incubated in 100 µL of X-VIVO<sup>15</sup> with FVIII (0, 50, 100, 200 or 400 IU mL<sup>-1</sup>), either at 4 °C or 37 °C. After the incubation period, cells were washed thoroughly with ice-cold PBS. Intracellular FVIII was recognized after permeabilization with 0.1% saponin, using the FITC-labelled monoclonal antibody (mAb77IP52H7, 10 µg mL<sup>-1</sup>, a kind gift from LFB, Les Ulis, France), directed to the A2 domain of FVIII. Percentages of cells positive for FVIII were analysed by flow cytometry. Uptake was quantified as the difference in the % cells at 37 °C and 4 °C.

### *Activation of FVIII-specific T-cell hybridoma*

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

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

### Mice

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

### Titration of anti-FVIII IgG

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

### Titration of FVIII inhibitors

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

## Results

### Binding of Refacto<sup>®</sup> AF to CD206

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

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

### Endocytosis of Refacto<sup>®</sup> AF by human dendritic cells and activation of a FVIII-specific T-cell hybridoma

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

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

### Immunogenicity of Refacto<sup>®</sup> AF in FVIII-deficient mice

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

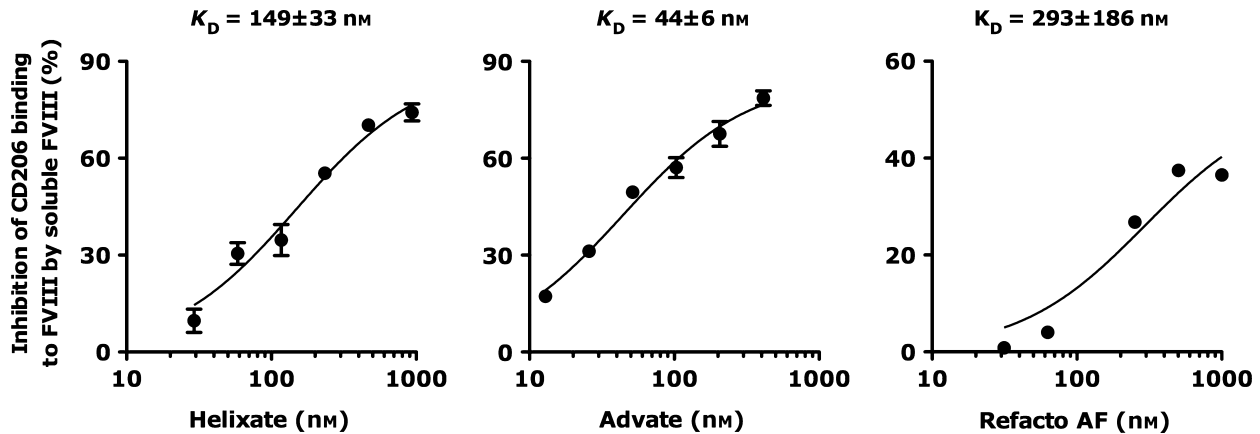


Fig. 1. Interaction of ReFacto<sup>®</sup> AF with CD206. Recombinant human CD206 ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was preincubated with increasing concentrations of each FVIII product. Samples were then incubated with immobilized FVIII (Kogenate<sup>®</sup>/Helixate<sup>®</sup>). The bound rhCD206 was revealed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

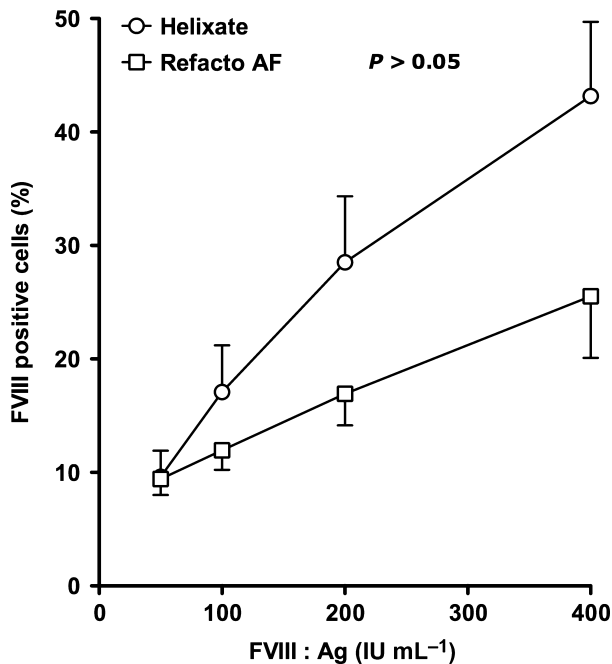


Fig. 2. Dose-dependent endocytosis of ReFacto<sup>®</sup> AF by DCs. Five-day-old monocyte-derived human DCs were incubated in X-VIVO<sup>15</sup> medium containing  $0\text{--}80 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0\text{--}400 \text{ IU mL}^{-1}$ ) of either Kogenate<sup>®</sup>/Helixate<sup>®</sup> or ReFacto<sup>®</sup> AF. Results are means of seven independent experiments. Error bars indicate SEM.

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

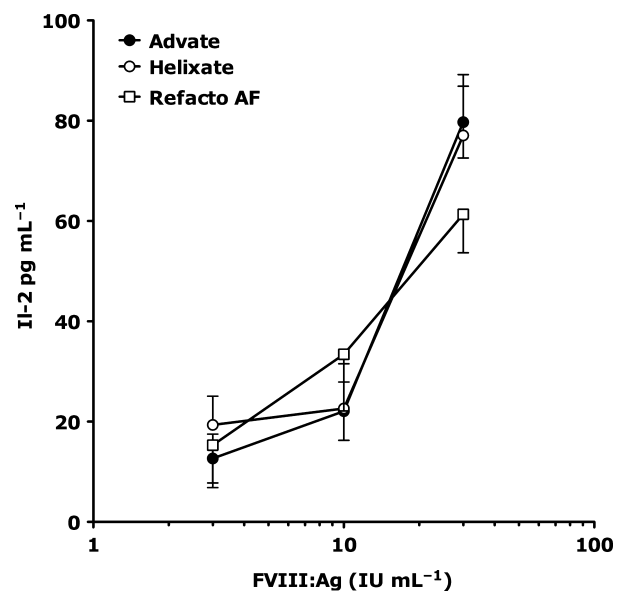


Fig. 3. Activation of FVIII-specific T cells by FVIII-loaded human MO-DCs. Five-day old immature MO-DCs from a healthy donor with the HLA class II DRB1\*0101/0301 haplotypes were cultured with the 1G8-A2 FVIII-specific HLA-DRB1\*0101-restricted mouse T-cell hybridoma in the presence of the different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

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

## Discussion

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

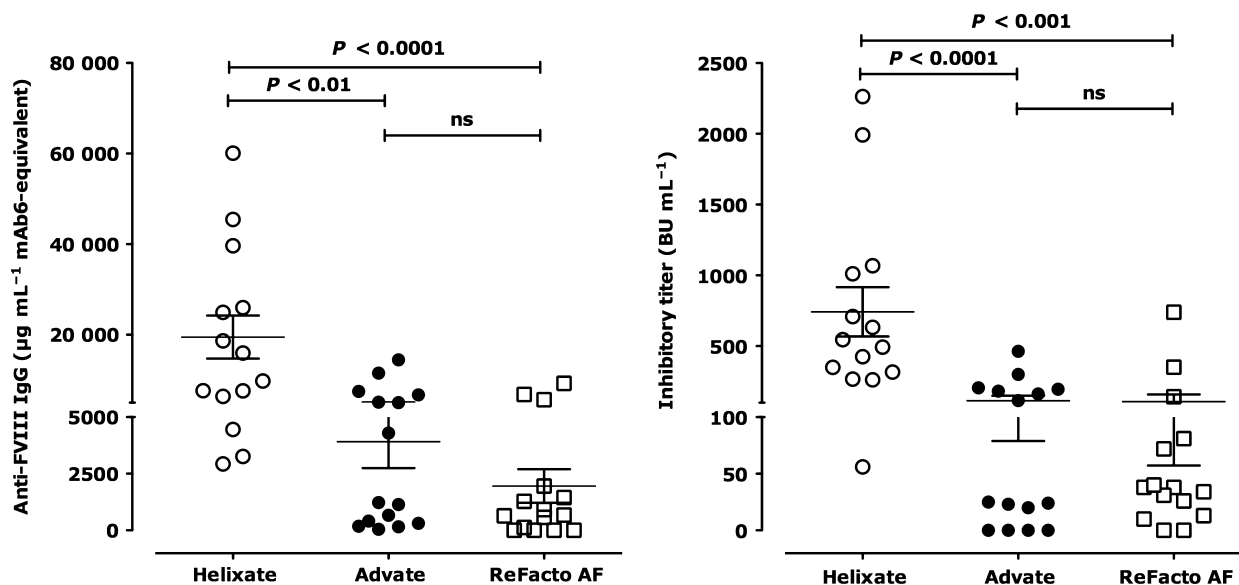


Fig. 4. Immunogenicity of ReFacto<sup>®</sup> AF in FVIII-deficient mice. Helixate<sup>®</sup>, Advate<sup>®</sup> and ReFacto<sup>®</sup> AF were administered iv to FVIII-deficient mice once a week for 4 weeks. Mice were bled 5 days after the last FVIII injection and anti-FVIII IgG in serum were quantified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

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

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

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

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

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

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

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

## Acknowledgements

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

## Author contributions

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

## Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

## References

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

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

# Complement C3 is a novel modulator of the anti-factor VIII immune response

Julie Rayes,<sup>1,2,3\*</sup> Mathieu Ing,<sup>1,2,3\*</sup> Sandrine Delignat,<sup>1,2,3</sup> Ivan Peyron,<sup>1,2,3</sup> Laurent Gilardin,<sup>1,2,3</sup> Carl-Wilhelm Vogel,<sup>4,5</sup> David C. Fritzing,<sup>4</sup> Véronique Frémeaux-Bacchi,<sup>1,2,3,6</sup> Srinivas V. Kaveri<sup>1,2,3</sup> Lubka T. Roumenina<sup>1,2,3</sup> and Sébastien Lacroix-Desmazes<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; <sup>2</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR S 1138, France; <sup>3</sup>Université Paris Descartes, UMR S 1138, France; <sup>4</sup>University of Hawaii Cancer Center, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI, USA; <sup>5</sup>Department of Pathology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI, USA and <sup>6</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d'Immunologie Biologique, Hôpital Européen Georges-Pompidou, France

\*JR and MI contributed equally to the work.



**Haematologica** 2018  
Volume 103(2):351-360

## ABSTRACT

Development of neutralizing antibodies against therapeutic Factor VIII (FVIII) is the most serious complication of the treatment of hemophilia A. There is growing evidence to show the multifactorial origin of the anti-FVIII immune response, combining both genetic and environmental factors. While a role for the complement system on innate as well as adaptive immunity has been documented, the implication of complement activation on the onset of the anti-FVIII immune response is unknown. Here, using *in vitro* assays for FVIII endocytosis by human monocyte-derived dendritic cells and presentation to T cells, as well as *in vivo* complement depletion in FVIII-deficient mice, we show a novel role for complement C3 in enhancing the immune response against therapeutic FVIII. *In vitro*, complement C3 and its cleavage product C3b enhanced FVIII endocytosis by dendritic cells and presentation to a FVIII-specific CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma. The C1 domain of FVIII had previously been shown to play an important role in FVIII endocytosis, and alanine substitutions of the K2092, F2093 and R2090 C1 residues drastically reduce FVIII uptake *in vitro*. Interestingly, complement activation rescued the endocytosis of the FVIII C1 domain triple mutant. In a mouse model of severe hemophilia A, transient complement C3 depletion by humanized cobra venom factor, which does not generate anaphylatoxin C5a, significantly reduced the primary anti-FVIII immune response, but did not affect anti-FVIII recall immune responses. Taken together, our results suggest an important adjuvant role for the complement cascade in the initiation of the immune response to therapeutic FVIII.

## Introduction

Hemophilia A is a rare X-linked inherited hemorrhagic disorder consecutive to the absence of functional pro-coagulant Factor VIII (FVIII). Prevention or treatment of bleeding consists of replacement therapy with exogenous FVIII. However, up to 30% of the patients develop antibodies of IgG isotype that neutralize the procoagulant activity of therapeutic FVIII, and are referred to as FVIII inhibitors.<sup>1</sup> The immune response that develops against therapeutic FVIII is thought to be a classical T-cell dependent immune response to a foreign glycoprotein antigen. Thus, the antibody response and the nature of the implicated T cells have been extensively characterized.<sup>2</sup> The initiation of a naïve T-cell-dependent immune response requires that the antigen-presenting cells (APCs) endocytose the target antigen. The APCs also need to receive appropriate maturation signals, referred to as “danger signals”, in order to mature and present the processed antigen to CD4<sup>+</sup> T cells in an immunogenic context. In the case of the immune response to therapeutic FVIII, the

## Correspondence:

sebastien.lacroix-desmazes@crc.jussieu.fr

Received: January 31, 2017.

Accepted: November 10, 2017.

Pre-published: November 16, 2017.

doi:10.3324/haematol.2017.165720

Check the online version for the most updated information on this article, online supplements, and information on authorship & disclosures: [www.haematologica.org/content/103/2/352](http://www.haematologica.org/content/103/2/352)

©2018 Ferrata Storti Foundation

Material published in *Haematologica* is covered by copyright. All rights are reserved to the Ferrata Storti Foundation. Use of published material is allowed under the following terms and conditions:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>. Copies of published material are allowed for personal or internal use. Sharing published material for non-commercial purposes is subject to the following conditions: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>, sect. 3. Reproducing and sharing published material for commercial purposes is not allowed without permission in writing from the publisher.



nature of the danger signals that adjuvant the anti-FVIII immune response and permit activation of naïve FVIII-specific CD4<sup>+</sup> T cells is not known. A role for bleeding and inflammation in the development of FVIII inhibitor has been proposed by several authors.<sup>3-5</sup>

The *in vitro* study of FVIII endocytosis has consistently been performed using serum-free medium or medium containing heat-inactivated serum,<sup>6-10</sup> thus ignoring a potential role for the complement system in the observed mechanism. The complement system plays a major role in the development of immune responses.<sup>11</sup> It is an integral part of the innate and adaptive host defense. Complement activation occurs through different pathways: the classical pathway is triggered by C1q binding to immune complexes, the lectin pathway is triggered by the binding of mannose binding lectin to mannose residues on pathogens, and the alternative pathway is spontaneously and continuously activated at a low rate (i.e. spontaneous C3 tick-over).<sup>12,13</sup> Inappropriate complement triggering is pathogenic and has been associated with autoimmune reactions.<sup>14</sup>

In the present work, we investigated the role of the complement system in the initiation and development of the anti-FVIII immune response. We demonstrate that transient depletion of complement using humanized cobra venom factor (hCVF) dampens the intensity of the primary anti-FVIII immune response in FVIII-deficient mice. We propose that initiation of the anti-FVIII immune response involves, at least in part, facilitation of FVIII endocytosis by C3 and its activation fragment C3b.

## Methods

### Antibodies and reagents

Full length FVIII was either a kind gift from CSL-Behring (Helixate® NexGen, Marburg, Germany) or from Baxter (Recombinate®, Maurepas, France). Recombinant human A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13 (ADAMTS-13) was a kind gift from Baxter. Complement human proteins Factor B, Factor D, C3, C3b and C3-depleted serum were purchased from Complement Technology (Comptech, TX, USA) and Merck Millipore (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK). Human serum was obtained from AB blood type healthy donors. Antibodies against CD1a, CD3, CD14, CD40, CD83, CD86, HLA-DR, CD206, low density lipoprotein receptor-related protein (LRP, CD91), CD209, CD68 and APC-labeled Annexin V were purchased from BD Pharmingen (San Jose, CA, USA). Antibody against CD20 was purchased from eBiosciences (San Diego, CA, USA).

The biotinylated monoclonal mouse anti-human FVIII antibody GMA-8015 and sheep polyclonal anti-human FVIII (SAF8C) were from Green Mountain Antibodies (Burlington, VT, USA) and Affinity Biological (Ancaster, Canada). The monoclonal anti-human FVIII antibody 77IP52H7 was a kind gift from LFB (Les Ulis, France). The biotinylated monoclonal mouse anti-human ADAMTS-13 antibody (20A5) and polyclonal goat anti-mouse C3b/iC3b (clone A209) were from Clinisciences (Nanterre, France) and Quidel (San Diego, USA), respectively.

### Generation and production of recombinant wild-type or mutated FVIII, and of humanized cobra venom factor

The wild-type human B-domain-deleted (BDD) FVIII (FVIII<sup>HSC</sup>) and the R2090A-K2092A-F2093A FVIII mutant (FVIII<sup>CI</sup>) were generated and purified as described previously.<sup>15,16</sup> Preparation of the

plasmid expressing HC3-1496, and expression and purification of HC3-1496 were performed as described previously for the preparation of pMB-HC3-1348.<sup>17</sup> Details are provided in the *Online Supplementary Appendix*.

### Generation of human immature monocyte-derived dendritic cells and monocyte-derived macrophages

Monocytes were isolated from the blood of healthy donors using anti-CD14<sup>+</sup> magnetic microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France). Monocytes were incubated in RPMI-1640 (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with GM-CSF (1000 IU/10<sup>6</sup> cells) and IL-4 (500 IU/10<sup>6</sup> cells) (Miltenyi Biotec) for five days to generate immature monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs). The immature status was confirmed by flow cytometry (LSR II, BD Biosciences, Le Pont au Claix, France) with a CD1a, CD14, CD80, CD86, CD83, CD40 and HLA-DR staining. To differentiate monocytes into macrophages (MO-Φ), cells were plated in RPMI-1640 supplemented with M-CSF (ImmunoTools, Friesoythe, Germany, 100 ng/10<sup>6</sup> cells) for five days. Macrophage phenotype was confirmed by flow cytometry with CD68 staining.

### Isolation of circulating human blood dendritic cells

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

### Uptake of antigens by immature MO-DCs

FVIII (50 nM, Helixate®), FVIII<sup>HSC</sup> (50 nM), FVIII<sup>CI</sup> (50 nM), ADAMTS-13 (50 nM) conjugated to Dylight 633 (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) or human Factor IX (50 nM, Benefix, Pfizer, France) were incubated with 20% normal serum (NS), heat-inactivated (56°C for 30 min) serum (HIS) or C3-depleted serum (ΔC3) in RPMI-1640 at 37°C for 1 hour (h). When indicated, FVIII or Dylight 633-labeled ADAMTS-13 were incubated with C3 (250 μg/mL), Factor B (50 μg/mL) and Factor D (1 μg/mL) or with C3b (250 μg/mL) in 20 mM HEPES 150 mM NaCl 10 mM MgCl<sub>2</sub> for 1 h at 37°C. Samples were then incubated with 5-day-old immature MO-DCs (2.10<sup>5</sup> cells/100 μL) for 2 h at 4°C or 37°C. Cells were washed with ice-cold phosphate buffer saline, fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). In the case of FVIII, cells were permeabilized using 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) and stained with an FITC-conjugated monoclonal mouse anti-human FVIII IgG (77IP52H7). Cells were analyzed by flow cytometry and data were computed using the BD FACS Diva software (v.6.1, BD Biosciences). The uptake was quantified as the difference in the median fluorescence intensities between 37°C and 4°C (ΔMFI<sub>37°C-4°C</sub>) to exclude the signal generated by the binding of FVIII to the cell surface.

### Stimulation of an FVIII-specific HLA-DRB1\*0101-restricted mouse CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma

Activation of the HLA-DRB1\*0101-restricted mouse CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma specific for human FVIII (1G8-A2), was assessed as described previously.<sup>18</sup> FVIII (10 nM) was incubated with 20% NS, HIS or ΔC3 serum in RPMI-1640 supplemented with 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 10 mM MgCl<sub>2</sub> for 1 h at 37°C. Samples were then incubated with 5-day-old MO-DCs (10<sup>4</sup> cells/condition) generated from healthy donors with the DRB1\*0101 haplotype, for 2 h at 37°C to allow FVIII uptake. MO-DCs were then washed, suspended in X-VIVO<sup>15</sup> medium, and co-cultured with 10<sup>5</sup> 1G8-A2 CD4<sup>+</sup> T cells for 18 h at 37°C. Controls included T cells incubated alone, or incubated with MO-DCs in the presence of concanavalin A (2 μg/mL, Sigma-Diagnostics, MO, USA) or in the absence of FVIII.

Levels of interleukine-2 secreted by T cells were assessed using BD OptEIA™ mouse IL-2 ELISA set (BD Biosciences).

### FVIII binding to immobilized C3b by ELISA

C3b was coated on ELISA plates at 10 nM in sodium bicarbonate buffer (pH 9.4) overnight at 4°C. Wells were blocked in PBS-5% bovine serum albumin (BSA). FVIII was diluted in blocking buffer and incubated on C3b-coated wells for 1 h at 37°C. Bound FVIII was revealed using a biotinylated monoclonal mouse anti-human FVIII antibody GMA-8015, streptavidin-HRP (R&D Systems, Lille, France) and the HRP o-phenylenediamine dihydrochloride substrate (OPD, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As a control, bound ADAMTS-13 was revealed using the biotinylated mouse anti-human ADAMTS-13 antibody, 20A5.

### Co-localization of FVIII and C3b by immunofluorescence

FVIII (50 nM, Helixate®) or buffer alone were incubated in the presence of 20% HIS or NS for 1 h at 37°C in RPMI-1640. The mixture was added on MO-DCs (250,000 cells) for 2 h at 37°C. After washing with ice-cold PBS, cells were fixed using 3.7% paraformaldehyde and permeabilized. FVIII and C3b/iC3b were recognized after incubation with anti-human FVIII SAF8C (2 µg/mL) and a polyclonal anti-mouse C3b/iC3b (10 µg/mL) antibody for 30 minutes (min) at room temperature under agitation followed by the addition of the secondary A647-conjugated donkey anti-sheep IgG and A488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, USA), respectively. After washing, nuclei were stained with Hoechst®33342 (Sigma-Aldrich) and dendritic cells were plated onto poly-L-lysine coated slides using cytospin centrifugation (5 min at 1500 rpm), and mounted in ProLong Diamond Anti-Fade Mountant (Molecular Probes). Images were acquired with LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

### Animals and administration of FVIII

Exon 16 FVIII-deficient mice on the C57Bl/6 background (a gift from Prof. H.H. Kazazian, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA) were 8-15 weeks old. Mice were injected intravenously with 1 µg human recombinant FVIII (Helixate®) once a week for four weeks. Blood was collected five days after the last FVIII administration. Plasma was isolated and kept at -80°C until use.

### In vivo complement blockade

Complement was depleted in FVIII-deficient mice by intraperitoneal injection of 20 µg of hCVF. Importantly, hCVF does not cleave C5.<sup>19</sup> C3 levels in plasma were measured by sandwich ELISA, using a polyclonal goat anti-mouse C3 antibody (MP Biomedicals, Illkirch, France) to capture C3 and a biotinylated polyclonal goat anti-mouse C3 antibody, followed by streptavidin-HRP and OPD substrate, to reveal bound C3. hCVF administration occurred 6 h prior to FVIII administration.

### Titration of anti-FVIII IgG and FVIII inhibitors

ELISA plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with FVIII (1 µg/mL, Recombinate®) overnight at 4°C. After blocking with PBS-1% BSA, plasma was incubated for 1 h at 37°C. Bound IgG were revealed using an HRP-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG antibody (Southern Biotech, Anaheim, CA, USA) and the OPD substrate. Absorbance was read at 492 nm. The monoclonal mouse FVIII heavy chain-specific IgG mAb6 (a gift from Dr J.M. Saint-Remy, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium) was used as a standard. FVIII inhibitors were measured by incubating heat-inactivated mouse plasma with human standard plas-

ma (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) for 2 h at 37°C. The residual FVIII pro-coagulant activity was measured using a chromogenic assay (Siemens Healthcare Diagnostics). Results are expressed in Bethesda Units (BU/mL) that correspond to the reciprocal dilution of the mouse plasma that yields 50% residual FVIII activity.

### Ethical considerations

Mice were handled in agreement with French ethical authorities (authorization ns. 02058.04 and 8275.02). Ethical committee permission was obtained for the use of buffy bags from healthy donors to isolate monocytes.

## Results

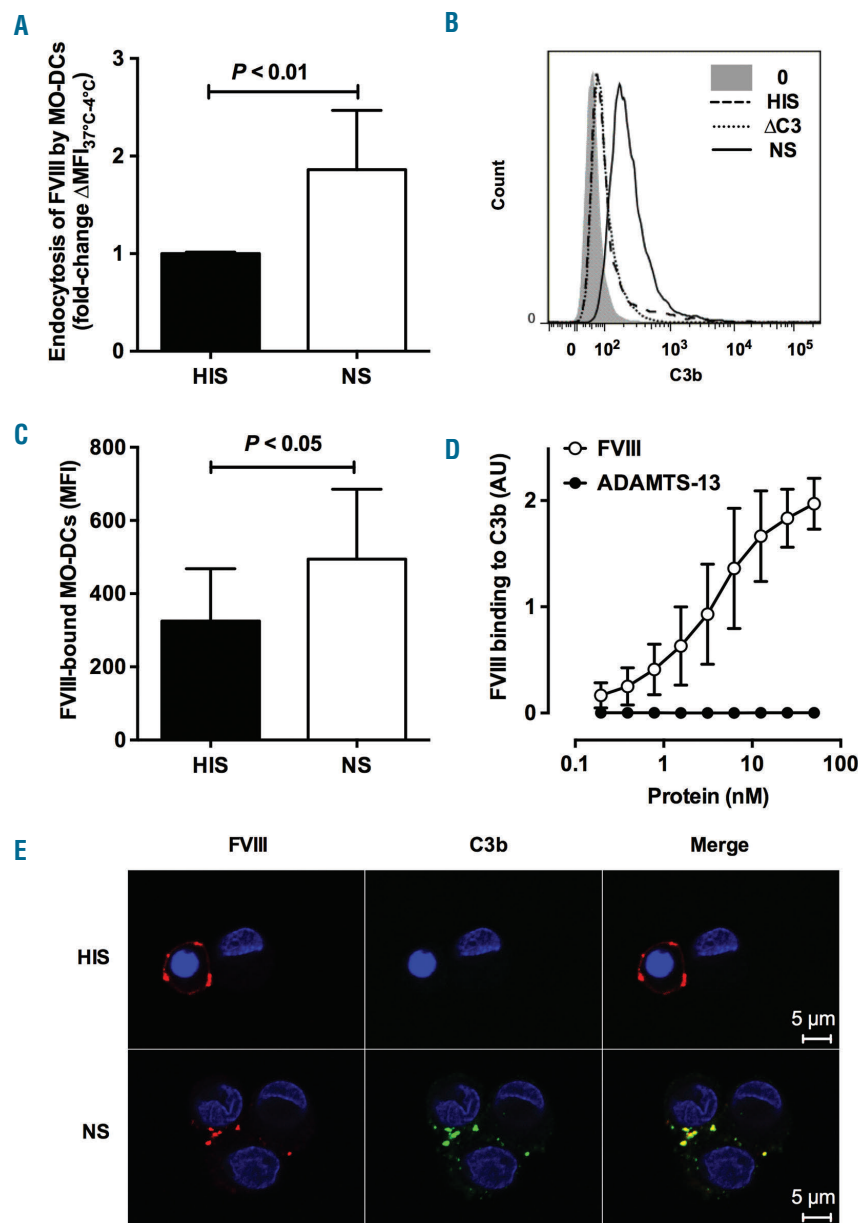
### Complement in FVIII endocytosis by MO-DCs and blood DCs but not MO-Φ

We first assessed FVIII endocytosis by MO-DCs using flow cytometry. Incubation of FVIII with immature human MO-DCs in the presence of normal serum (NS) resulted in a  $1.86 \pm 0.61$ -fold increase in FVIII uptake as compared to incubation in the presence of heat-inactivated serum (HIS) ( $P < 0.01$ ) (Figure 1A). The deposition of C3b at the cell surface upon incubation of immature MO-DCs in the presence of NS at 37°C (Figure 1B) confirmed complement activation. No deposition of C3b occurred when cells were incubated in the presence of C3-depleted serum. Opsonization of the cells by C3b was associated with an increased binding of FVIII to MO-DCs, as assessed by incubation at 4°C ( $P < 0.05$ ) (Figure 1C). Interestingly, a direct binding of FVIII to immobilized C3b was observed by ELISA (Figure 1D), while ADAMTS-13, used as a control antigen, failed to bind to C3b. In line with this, immunofluorescence confirmed the co-localization of FVIII and C3b on MO-DCs (Figure 1E and *Online Supplementary Figure S2*). Taken together, the data suggest a role for C3b in facilitating FVIII capture and internalization by MO-DCs. Of note, incubation with NS did not significantly modify the expression of LRP (CD91) and CD206 (two endocytic receptors for FVIII) or DC-SIGN (CD209) (*Online Supplementary Figure S1*).

Incubation of FVIII with purified circulating blood DCs from healthy donors in the presence of NS yielded a 3-fold increase in FVIII uptake ( $P < 0.05$ ) (Figure 2A), while it had only a marginal effect on FVIII uptake in the case of MO-Φ (Figure 2B). Interestingly, the presence of complement did not alter the endocytosis by MO-DCs of human recombinant ADAMTS-13 and Factor IX, used as control antigens (Figure 2C and D).

### Complement C3 participates in FVIII endocytosis by MO-DCs leading to presentation to CD4<sup>+</sup> T cells

Because the complement C3 molecule is the central component of the complement cascade, and because FVIII directly binds to C3b in ELISA and co-localizes with C3b on the cells, we assessed the involvement of C3 in FVIII endocytosis by dendritic cells. Levels of FVIII endocytosis by MO-DCs were similar in the presence of C3-depleted serum (ΔC3) and in the presence of HIS (Figure 3A and B). Importantly, incubation of MO-DCs with HIS, NS or ΔC3 lead to similar degrees of cell surface expression of phosphatidylserine, a ligand for activated FVIII at the surface of activated platelets<sup>20</sup> (*Online Supplementary Figure S3A*). Differences in FVIII endocytosis were thus not related to



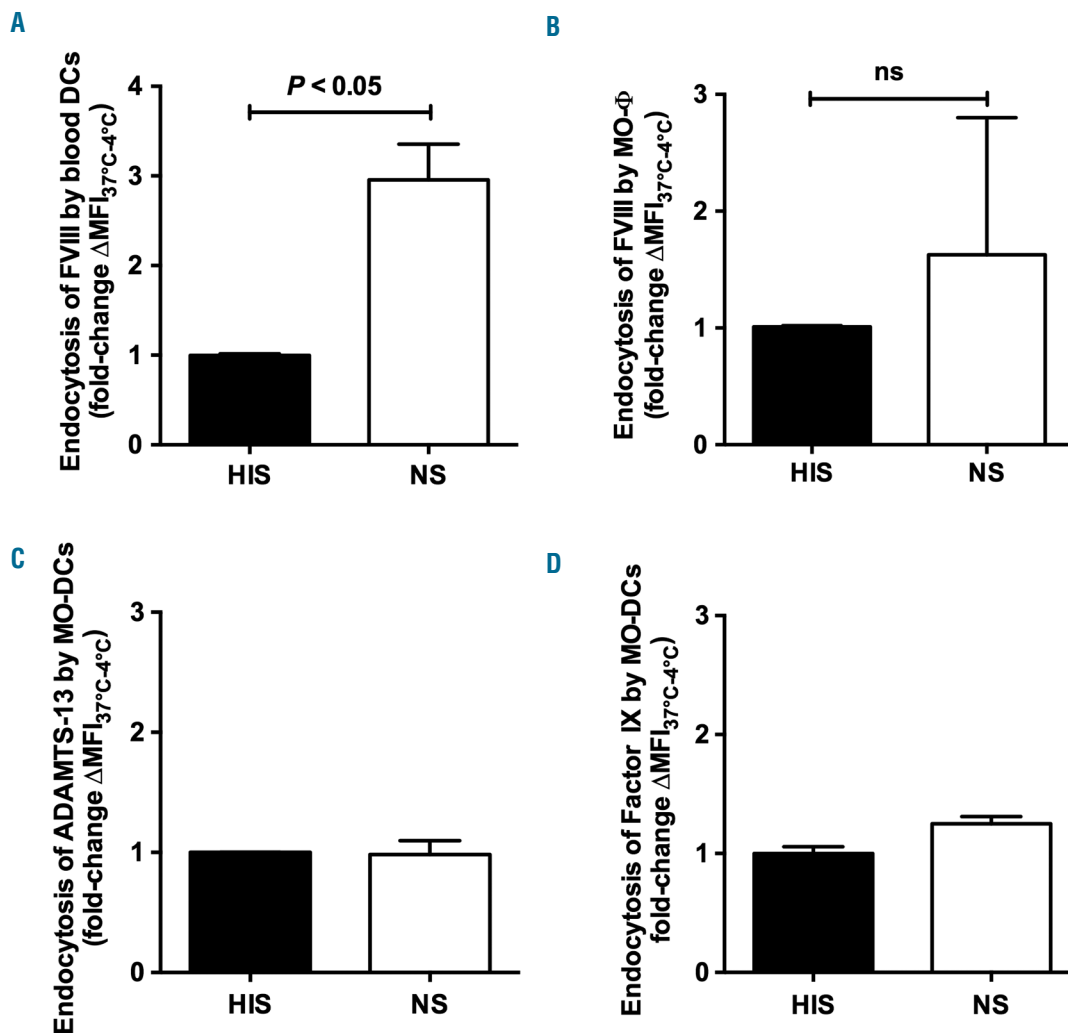
**Figure 1. Complement enhances Factor VIII (FVIII) endocytosis by human monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs).** (A, C and E) FVIII (50 nM) was incubated in 20% normal serum (NS) or in 20% heat-inactivated serum (HIS) for 1 hour (h) at 37 °C. Mixtures were added on 5-day-old immature MO-DCs ( $2.10^5$  cells in RPMI-1640) for 2 h at 4 °C or 37 °C. Mean fluorescence intensity (MFI) was measured by flow cytometry using an FITC-coupled anti-FVIII antibody. (A) MFI values measured at 4 °C were subtracted from values measured at 37 °C, in order to eliminate the signal due to the binding to the cell surface. Results represent the fold change of  $\Delta MFI_{37^{\circ}C-4^{\circ}C}$  measured for each condition versus  $\Delta MFI_{37^{\circ}C-4^{\circ}C}$  obtained in the presence of HIS. Data are shown as means  $\pm$  Standard Deviation (SD) of fold change of MFI measured in the case of NS versus that measured in the case of HIS ( $n=6$ ). Dead cells were excluded using fixable viability dye. (B) MO-DCs were incubated alone (gray area), with NS (full line curve), HIS (broken line curve) or C3-deficient plasma ( $\Delta C3$ , dotted line curve) for 1 h at 37 °C. Surface-bound C3b was detected by flow cytometry using an anti-C3b antibody. Results are shown as histograms. (C) FVIII bound at the surface of the cells was detected by flow cytometry following incubation of FVIII with the cells at 4 °C. (D) The binding of FVIII and ADAMTS-13 to immobilized C3b (10 nM) was measured by ELISA using specific anti-FVIII or anti-ADAMTS-13 IgG. The results are expressed in optical density (OD) measured at 492 nm. (C and D) Mean  $\pm$  SD of at least 3 independent experiments. Statistical significance was assessed using the double-sided non-parametric Mann-Whitney test (A) or paired Wilcoxon test (C). (E) The co-localization of FVIII (red) and C3b (green) was assessed by immunofluorescence, using polyclonal anti-human FVIII and anti-C3b/iC3b antibodies and the appropriate fluorescent-labeled secondary antibodies. Images were acquired by confocal microscopy. Control images obtained in the absence of FVIII are shown in Online Supplementary Figure S1.

different levels of phosphatidylserine expression (i.e. apoptosis) on MO-DCs.

To confirm that the reduced FVIII endocytosis observed upon C3 depletion results in a reduced presentation to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, we assessed the activation of a CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma (1G8-A2) by MO-DCs incubated with FVIII in the presence of the different serum preparations. Importantly, the use of the T-cell hybridoma provides an opportunity to work with FVIII concentrations closer to those reached in patients with replacement therapy. The activation of 1G8-A2, assessed by the secretion of interleukine-2 (IL-2),<sup>18</sup> was significantly higher when FVIII was incubated with MO-DCs in the presence of NS ( $541 \pm 123$  pg/mL of IL-2) (Figure 3C) as compared to HIS ( $217 \pm 132$  pg/mL;  $P \leq 0.05$ ) or to  $\Delta C3$  serum ( $238 \pm 61$  pg/mL;  $P \leq 0.01$ ). There was no activation of 1G8-A2 when MO-DCs were incubated with the different serum prepara-

tions in the absence of FVIII. Of note, incubation of immature human MO-DCs with HIS, NS or  $\Delta C3$  serum did not induce DC maturation *in vitro*, as assessed by the surface expression of co-stimulatory CD40, CD80, CD86, and maturation CD83 molecules, and of HLA-DR (Online Supplementary Figure S4).

We then evaluated the role of C3b in FVIII endocytosis by MO-DCs in the absence of serum proteins. We co-incubated FVIII with either purified C3b or with an artificially reconstituted C3 convertase containing C3, Factor B and Factor D. The reconstituted C3 convertase leads to the generation of C3b as confirmed by western blot (*data not shown*). Samples were then added to MO-DCs and FVIII endocytosis was monitored by flow cytometry (Figure 3D). Co-incubation of immature MO-DCs with the C3 convertase or with C3b did not induce detectable apoptosis as assessed by the surface expression of phos-



**Figure 2. Complement enhances FVIII endocytosis by human professional antigen-presenting cells.** (A and B) FVIII (50 nM) Dylight 633-conjugated ADAMTS-13 (50 nM, panel C) or human recombinant FITC-labeled Factor IX (50 nM, panel D) were incubated in 20% normal serum (NS) or in 20% heat-inactivated serum (HIS) for 1 hour (h) at 37 °C. Mixtures were added on purified blood dendritic cells (DCs) (A), 5-day-old MO-Φ (B) or 5-day-old immature human monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) ( $2.10^5$  cells in RPMI-1640, panels C and D), for 2 h at 4 °C or 37 °C. Mean fluorescence intensity (MFI) was measured by flow cytometry using an FITC-coupled anti-FVIII antibody in the case of FVIII, or directly in the case of labeled ADAMTS-13 and Factor IX. MFI values measured at 4 °C were subtracted from values measured at 37 °C in order to eliminate the signal due to the binding to the cell surface. Results represent the fold change of  $\Delta\text{MFI}_{37^\circ\text{C}-4^\circ\text{C}}$  measured for each condition versus  $\Delta\text{MFI}_{37^\circ\text{C}-4^\circ\text{C}}$  obtained in the presence of HIS. Graphs depict mean  $\pm$  Standard Deviation (SD) of at least 3 independent experiments. Dead cells were excluded. Statistical significance was assessed using the double-sided non-parametric Mann-Whitney test. ns: not significant.

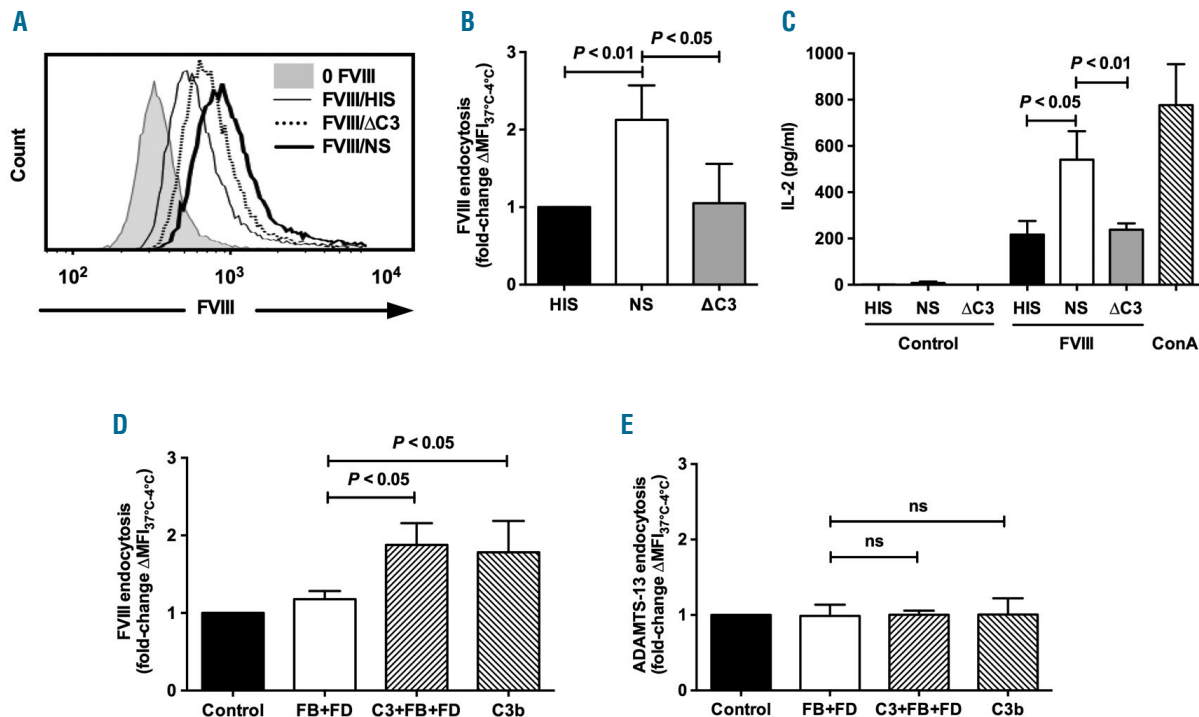
phatidylserine (Online Supplementary Figure S3B). FVIII endocytosis was significantly higher when FVIII was incubated in the presence of the whole C3 convertase ( $1.88 \pm 0.28$ -fold increase) or C3b ( $1.78 \pm 0.40$ -fold increase) than when FVIII was incubated with Factors B and D alone ( $P < 0.05$ ). Consistent with the fact that ADAMTS-13 did not bind to C3b, incubation of ADAMTS-13 with the C3 convertase or with C3b did not result in increased endocytosis by MO-DCs (Figure 3E).

We then compared the endocytosis by MO-DCs of a recombinant B-domain-deleted FVIII (FVIII<sup>H5Q</sup>) to that of a triple R2090A/F2092A/K2093A FVIII mutant (FVIII<sup>CI</sup>) in the absence and presence of complement activation. As previously reported using serum-free medium,<sup>9</sup> FVIII<sup>CI</sup> was not endocytosed by MO-DCs when incubated in HIS (Figure 4). In contrast, in the presence of NS, FVIII<sup>CI</sup> was endocytosed to levels similar to those reached with FVII-

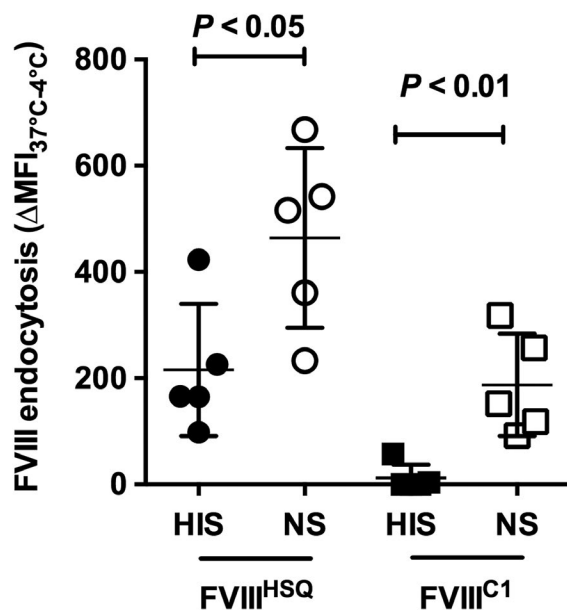
I<sup>H5Q</sup> incubated in HIS. Taken together, the data confirm a role for complement C3 in FVIII endocytosis by MO-DCs and presentation to T cells, independently of known endocytic receptors and critical FVIII residues.

#### Complement depletion decreases the primary immune response against FVIII in FVIII-deficient mice

Naïve FVIII-deficient mice were treated with hCVF prior to each administration of FVIII, in order to transiently deplete the complement C3 molecule in the blood. Injection of hCVF was followed by a 90% or more decrease of circulating C3 levels that lasted for at least 5 h (Online Supplementary Figure S5). The efficacy of hCVF-mediated C3 depletion was retained following repeated weekly administration to the same mice, indicating the absence of induction of a neutralizing immune response against hCVF (data not shown). Of note, hCVF lacks C5-



**Figure 3. Complement C3 enhances Factor VIII (FVIII) endocytosis by dendritic cells and presentation to CD4<sup>+</sup> T cells.** (A and B) FVIII (50 nM) was incubated for 1 hour (h) at 37 °C in 20% normal serum (NS), heat-inactivated serum (HIS) or C3-depleted serum ( $\Delta$ C3). Mixtures were added on immature human monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) ( $2.10^5$  cells in RPMI-1640) for 2 h at 4 °C or 37 °C. FVIII was then detected with a FITC-coupled anti-FVIII antibody. Mean fluorescence intensity (MFI) values measured at 4 °C were subtracted from values measured at 37 °C. (A) Histograms from FVIII-positive cells incubated with HIS (solid line), NS (bold line) and  $\Delta$ C3 (dashed line). The gray histogram depicts the fluorescence of cells incubated alone. (B) Fold-change of  $\Delta$ MFI<sub>37°C-4°C</sub> measured for each condition versus  $\Delta$ MFI<sub>37°C-4°C</sub> obtained in the presence of HIS. (C) DCs were differentiated from monocytes of healthy donors with the HLA-DRB1\*0101 haplotype. Five-day-old immature MO-DCs ( $10^4$  cells in X-VIVO<sup>®</sup>) were incubated alone (Control), with concanavalin A (2  $\mu$ g/mL, ConA) or with 10 nM FVIII in the presence of 20% normal serum (NS), heat-inactivated serum (HIS) or C3-depleted serum ( $\Delta$ C3) for 2 h at 37 °C. Cells were washed and incubated with an FVIII-specific HLA-DRB1\*0101-restricted mouse CD4<sup>+</sup> T-cell hybridoma for 18 h at 37 °C. Culture supernatants were collected and analyzed for IL-2 secretion. (D and E) FVIII (50 nM, panel D) or Dylight 633-conjugated ADAMTS-13 (50 nM, panel E) were incubated alone (Control), in the presence of Factor B (FB, 50  $\mu$ g/mL) and Factor D (FD, 1  $\mu$ g/mL) with or without C3 (250  $\mu$ g/mL), or in the presence of C3b (250  $\mu$ g/mL) for 1 h at 37 °C. Samples were then incubated with 5-day-old immature MO-DCs ( $2.10^5$  cells in X-VIVO<sup>®</sup>) for 2 h at 4 °C or 37 °C. MFI was measured by flow cytometry using a FITC-coupled anti-FVIII antibody in the case of FVIII or directly in the case of labeled ADAMTS-13. MFI values measured at 4 °C were subtracted from values measured at 37 °C. Results represent the fold change of  $\Delta$ MFI<sub>37°C-4°C</sub> measured for each condition versus  $\Delta$ MFI<sub>37°C-4°C</sub> measured with FVIII alone (Control). All results are expressed as mean  $\pm$  Standard Deviation (SD) and are representative of at least 5 independent experiments. Statistical significance was assessed using the double-sided non-parametric Mann-Whitney test. ns: non-significant.



convertase activity and hence does not generate the potent pro-inflammatory C5a anaphylatoxin.<sup>19,21</sup> FVIII-deficient mice treated with hCVF prior to FVIII infusion demonstrated significantly reduced levels of anti-FVIII IgG titers in plasma, as compared to the PBS control group [ $5 \pm 67$  vs.  $267 \pm 245$   $\mu$ g/mL mAb6-equivalent, respectively, mean  $\pm$  Standard Deviation (SD);  $P < 0.0001$ ] (Figure 5A), as well as reduced inhibitory titers ( $66 \pm 55$  vs.  $195 \pm 97$  BU/mL), respectively; depletion decreases the primary immune response against FVIII in FVIII-deficient mice,  $P < 0.0001$  (Figure 5B). Of note, depletion of C3 using hCVF did not significantly affect the half-life of FVIII in

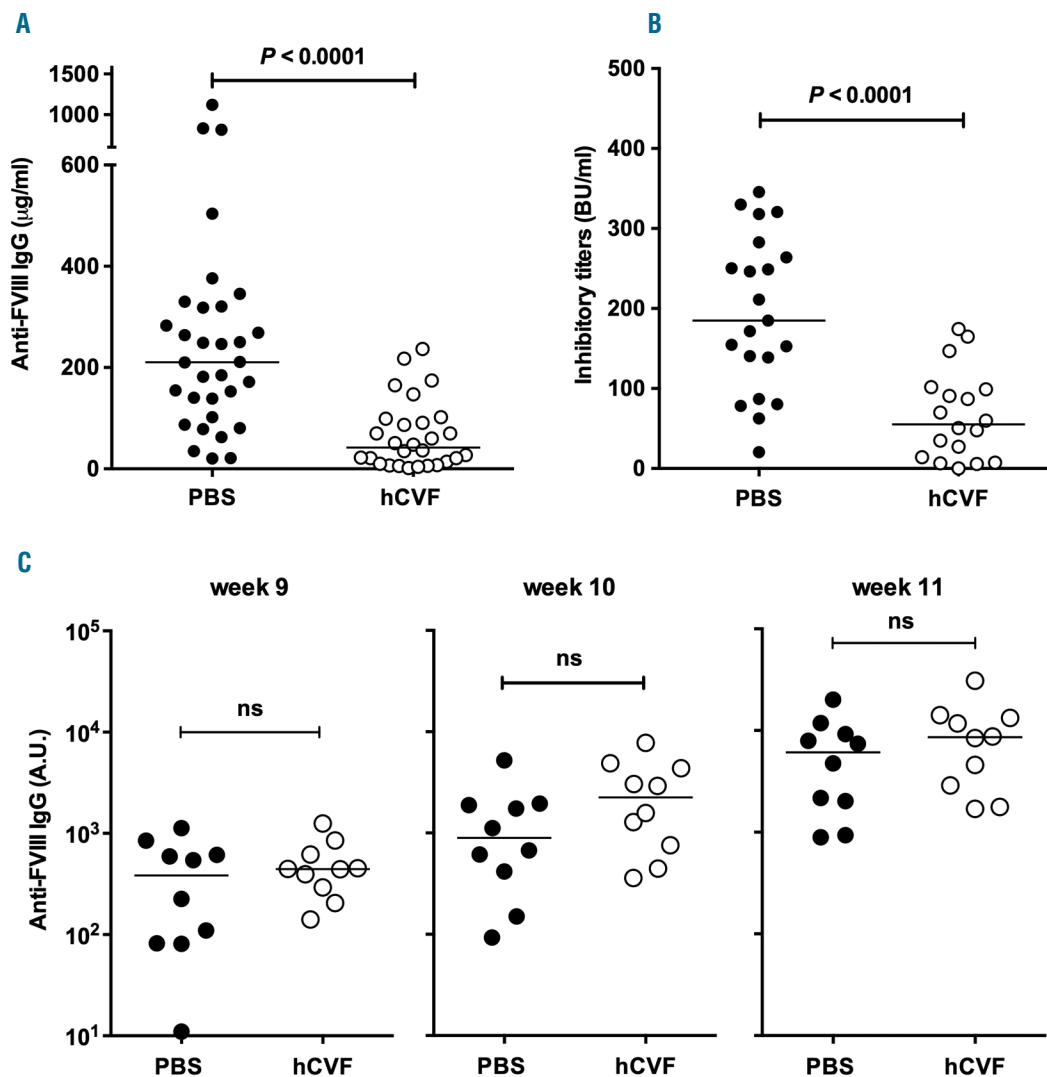
**Figure 4 (Left). Complement rescues the endocytosis of a triple Factor VIII (FVIII) FVIII<sup>C1</sup> mutant by dendritic cells.** Recombinant wild-type (FVIII<sup>WT</sup>) and mutated (FVIII<sup>C1</sup>) B-domain-deleted FVIII (50 nM) were incubated for 1 hour (h) at 37 °C in 20% normal serum (NS) or heat-inactivated serum (HIS). Mixtures were added on immature monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) ( $2.10^5$  cells in RPMI-1640) for 2 h at 4 °C or 37 °C. FVIII was then detected with a FITC-coupled anti-FVIII antibody directed to the A2 domain of FVIII. Mean fluorescence intensity (MFI) values measured at 4 °C were subtracted from values measured at 37 °C. Horizontal bars depict mean  $\pm$  Standard Deviation (SD) of 5 independent experiments. Statistical significance was assessed using the double-sided non-parametric Mann-Whitney test.

FVIII-deficient mice (*Online Supplementary Figure S6*). In contrast, administration of hCVF to primed FVIII-deficient mice did not have any effect on the recall anti-FVIII immune response (Figure 5C and *Online Supplementary Figure S7*).

## Discussion

Complement C3 has been shown to mediate antigen uptake by professional APCs and presentation to CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells.<sup>22</sup> Therefore, we investigated the role of complement in the endocytosis and presentation of FVIII by human APCs *in vitro*. The use of heat-treated serum, wherein the complement system is inactivated, was asso-

ciated with baseline levels of FVIII endocytosis by MO-DCs, as previously described.<sup>7,23,24</sup> Similar levels of endocytosis were observed when the serum was immune depleted from the C3 component. In contrast, the use of normal serum that allows activation of complement leads to an increased uptake of FVIII in the case of both MO-DCs and circulating blood DCs. In line with these data, normal serum enhanced presentation of FVIII to an FVIII-specific T-cell hybridoma, as compared to serum lacking active C3. Since heating of serum may affect proteins other than complement, we reconstituted the C3-convertase *in vitro* using purified proteins. *In vitro* reconstitution of the C3-convertase, or addition of the C3-activation fragment C3b, in the absence of other complement molecules was sufficient to restore close to maximal levels of FVIII endo-



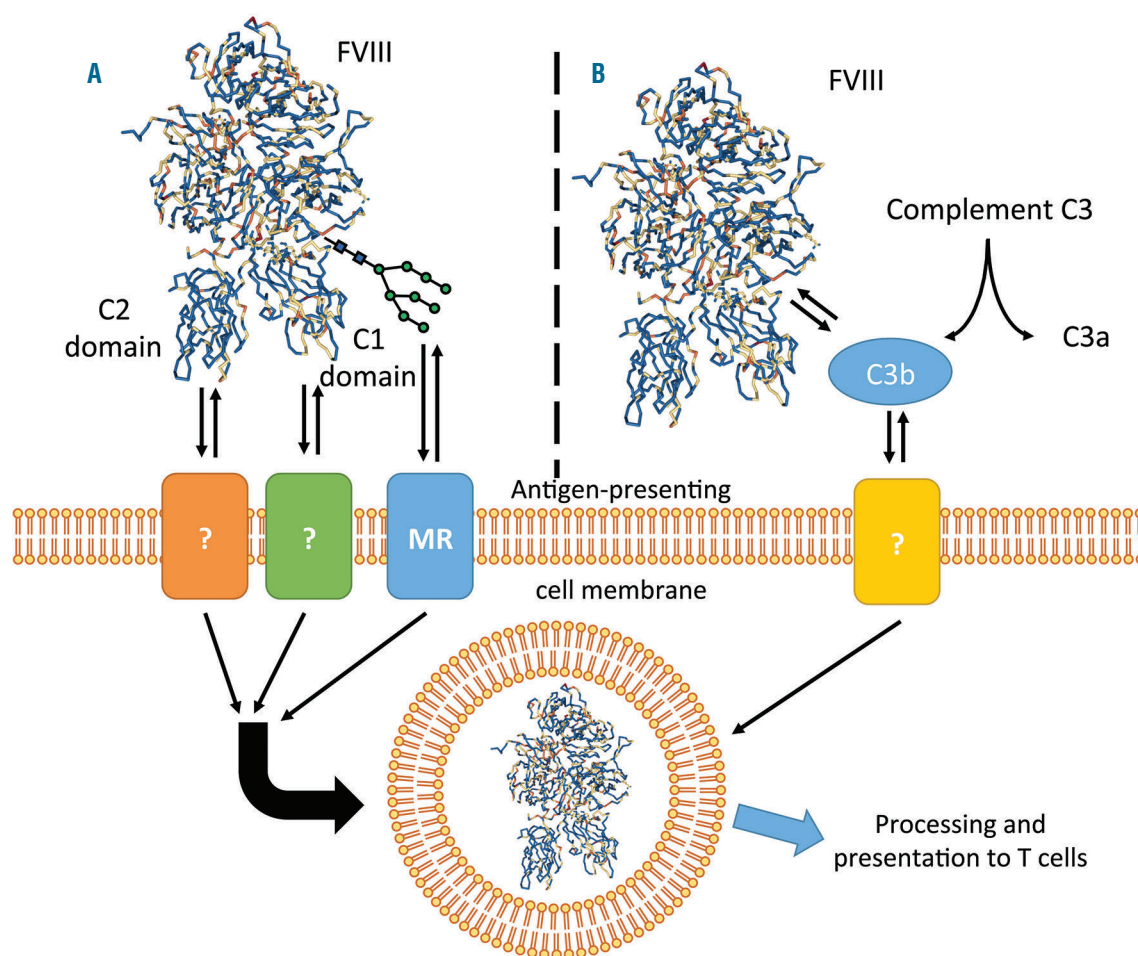
**Figure 5. Complement modulates the primary immune response to therapeutic Factor VIII (FVIII) *in vivo*.** (A and B) FVIII (1 µg/mouse) was injected intravenously to naïve FVIII-deficient mice 6 hours (h) after an intraperitoneal injection of hCVF (20 µg) or phosphate buffered saline (PBS), once a week for four weeks. At day 28, blood was collected. (C) Naïve FVIII-deficient mice were injected once a week for four weeks with FVIII (1 µg/mouse). At week 9, FVIII-primed mice were treated with either 20 µg hCVF or PBS, and 6 h later with FVIII. Blood was collected before hCVF/PBS injection and at weeks 10 and 11 (see *Online Supplementary Figure S7* for the protocol). Anti-FVIII IgG titers in plasma were assessed by ELISA (panels A and C, using the monoclonal mouse anti-FVIII antibody mAb6 as a standard) and FVIII inhibitory titers by chromogenic assay [panel B, expressed in Bethesda Units (BU) per milliliter]. Results are representative of 3 independent experiments. In all panels, horizontal bars represent medians, and statistical difference was assessed using the double-sided non-parametric Mann-Whitney test. ns: non-significant.

cytosis. In agreement with *in vitro* data, transient depletion of component C3 in naïve FVIII-deficient mice using hCVF resulted in a drastically reduced production of antibodies to exogenous FVIII.

Since the complement system is not expected to preferentially affect the specific immune response towards a particular antigen, we investigated the effect of complement on the endocytosis of ADAMTS-13. Human recombinant ADAMTS-13 was used as a control antigen for human recombinant FVIII, with the rationale that: i) recombinant ADAMTS-13 is being developed as a drug for replacement therapy to be used in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), which is reminiscent of the development of recombinant FVIII for hemophilia A patients; ii) ADAMTS-13, like FVIII, is endocytosed by MO-DCs in a CD206-dependent manner;<sup>24</sup> and, iii) as is seen in the case of FVIII, autoantibodies to endogenous ADAMTS-13 may develop, thus leading to acquired TTP. In contrast to the results obtained

in the case of FVIII, ADAMTS-13 did not bind to C3b, and *in vitro* complement activation or addition of C3b had no effect on the endocytosis of ADAMTS-13 by MO-DCs. The data suggest a selective role of complement in immune responses towards some glycoproteins, including FVIII.

The effect of complement on endocytosis was dependent on the cell type (i.e. blood DCs as well as MO-DCs, but not MO- $\Phi$ ) and on the antigen (i.e. FVIII, but not ADAMTS-13 or Factor IX), suggesting the involvement of particular endocytic pathway(s) in complement activation. It is not likely that activation of complement induces expression of endocytic receptors for FVIII at the surface of the cells due to the short incubation time used in our study. Accordingly, activation of complement on MO-DCs did not alter the surface expression of LRP (CD91) and CD206, which are known endocytic receptors for FVIII.<sup>7,25,26</sup> Particular FVIII moieties have been implicated in its uptake by APCs. Charged residues in the C1 and C2



**Figure 6. Endocytosis pathways for Factor VIII (FVIII) in the absence or presence of complement activation.** (A) In the absence of complement activation (i.e. use of de complemented serum or of serum-free medium in cell culture), FVIII is endocytosed by three known routes: key residues in the C1 and in the C2 domain interact with yet unknown endocytic receptors,<sup>27,28</sup> while high mannose-ending glycans at position 2118 on the C1 domain interact with the mannose-sensitive receptor CD206 (MR).<sup>7</sup> Of note, alteration of either of these structures (e.g. mutation of key residues in either the C1 domain or the C2 domain) leads to a more than 80% reduction in FVIII uptake, suggesting that these three endocytic pathways are interdependent. (B) In the presence of complement activation, C3b deposition on dendritic cells is associated with an increase in FVIII binding and internalization by dendritic cells (Figure 1A and C). Importantly, complement activation partially restores the uptake of the C1 FVIII mutant. The data suggest that complement engages yet unidentified endocytic pathways rather than those at play in the absence of complement activation.

domains of FVIII were recently shown to play critical roles in the endocytosis process. Masking of the R2090, F2092 and K2093 residues of the C1 domain by the monoclonal antibody Km33, or of the R2215 and R2220 residues of the C2 domain by the monoclonal antibody BO2C11, or mutation towards alanine residues, independently abrogate FVIII uptake by MO-DCs.<sup>9,27,28</sup> Importantly, the experiments leading to the identification of the latter pathways of FVIII uptake had been performed systematically in the presence of serum-free medium, and therefore did not allow assessment of whether complement has a role in the endocytic process. The fact that complement activation rescues, at least in part, the internalization of the triple FVIII<sup>C1</sup> mutant reveals the existence of novel endocytic pathways for FVIII, independently of charged residues in C1.<sup>27</sup> Together, the deposition of C3b at the surface of MO-DCs upon complement activation and the binding of FVIII to immobilized C3b in ELISA, suggest that FVIII interacts with the C3b deposited at the cell surface; this would in turn allow the recruitment of those as yet unidentified endocytic receptors (Figure 6).

The question as to the origin of complement C3 activation at the time of FVIII administration *in vivo* remains. Injection of FVIII into FVIII-deficient mice did not lead to detectable complement activation. Conversely, immune responses to FVIII developed in FVIII-deficient mice without any overt sign of spontaneous hemorrhage or inflammation,<sup>29</sup> and this was also seen in wild-type mice. However, the anti-FVIII immune response was drastically reduced in hemophilic mice upon exhaustion of C3 using hCVF. Under physiological conditions, a small fraction of the C3 molecules is hydrolyzed to C3(H<sub>2</sub>O), exposing new binding sites. The Factor B protease then binds C3(H<sub>2</sub>O) and is cleaved by Factor D, generating an initial C3 convertase, C3(H<sub>2</sub>O)Bb, that activates complement by cleaving C3 into its active fragments, C3a and C3b.<sup>30,31</sup> The continuously generated C3b indiscriminately binds to host cells and pathogens and initiates a set of cascade reactions.<sup>12,13</sup> Importantly, the C3(H<sub>2</sub>O)Bb convertase is more resistant to inactivation by Factor H and Factor I than is the C3bBb convertase.<sup>12</sup> Taken together, these data suggest that such a spontaneous tick-over of C3, leading to permanent C3b generation, is sufficient to facilitate FVIII uptake by professional APCs, thus setting the stage for the initiation of the anti-FVIII immune response *in vivo*. More gen-

erally, our data illustrate a novel biological role of C3 tick-over in the recognition of some non-particulate foreign antigens. In addition, the immune response to FVIII might be modulated by the cross-talks between the complement and coagulation cascades<sup>32</sup> or by the influence of von Willebrand factor on complement activation.<sup>33-35</sup>

Obviously, part of the anti-FVIII immune response does not depend on C3b and on activation of the complement cascade, as is suggested by the fact that: i) FVIII demonstrates substantial levels of endocytosis in the absence of complement activation; and ii) FVIII-deficient mice still develop anti-FVIII IgG when treated with hCVF. However, our results do highlight the existence of a new endocytic route for FVIII which is independent of the endocytosis mediated by the C1 domain of the molecule,<sup>27</sup> and which should lead to the identification of the endocytic receptors involved *in vivo*. Future studies should be conducted to decipher the contribution of each of the different pathways of complement activation in the inhibitory anti-FVIII immune response, and should also investigate whether temporary C3 depletion with hCVF is a promising therapeutic strategy to prevent the development of anti-FVIII antibody in patients with hemophilia A.

### Funding

*This study was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Paris 6, and by a grant from Pfizer (Aspire Haemophilia Research award 2016 WT12828). MI and IP were recipients of fellowships from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. LG was the recipient of a 'poste d'accueil INSERM' fellowship. FVIII<sup>HSQ</sup> in the ReNeo plasmid and BHK-M cells were kind gifts from Prof. Pete Lollar (Aflac Cancer and Blood Disorders Center, Department of Pediatrics, Emory University, Atlanta, GA, USA). Recombinant ADAMTS-13 and FVIII were kind gifts from Baxter Innovations GmbH (Vienna, Austria), and CSL-Behring (Marburg, Germany), respectively.*

### Acknowledgments

*We also would like to thank the staff from the Centre d'Imagerie Cellulaire et Cytométrie platform and Centre d'Expérimentation Fonctionnelle for assistance (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris).*

## References

- Ehrenforth S, Kreuz W, Scharer I, et al. Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *Lancet*. 1992;339(8793):594-598.
- Lacroix-Desmazes S, Navarrete AM, Andre S, Bayry J, Kaveri SV, Dasgupta S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A. *Blood*. 2008;112(2):240-249.
- 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.
- Dimitrov JD, Dasgupta S, Navarrete AM, et al. Induction of heme oxygenase-1 in factor VIII-deficient mice reduces the immune response to therapeutic factor VIII. *Blood*. 2010;115(13):2682-2685.
- Kurnik K, Auerswald G, Kreuz W. Inhibitors and prophylaxis in paediatric haemophilia patients: focus on the German experience. *Thromb Res*. 2014;134 (Suppl 1):S27-32.
- Castro-Nunez L, Dienava-Verdoold I, Herczenik E, Mertens K, Meijer AB. Shear stress is required for the endocytic uptake of the factor VIII-von Willebrand factor complex by macrophages. *J Thromb Haemost*. 2012;10(9):1929-1937.
- 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 USA*. 2007;104(21):8965-8970.
- 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.
- Herczenik E, van Haren SD, Wroblewska A, et al. Uptake of blood coagulation factor VIII by dendritic cells is mediated via its C1 domain. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(2):501-509.
- Sorvillo N, Hartholt RB, Bloem E, et al. von Willebrand factor binds to the surface of dendritic cells and modulates peptide presentation of factor VIII. *Haematologica*. 2016;101(3):309-318.

11. Merle N, Church S, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina L. Complement system part I - molecular mechanisms of activation and regulation. *Front Immunol.* 2015;6:262.
12. Bexborn F, Andersson PO, Chen H, Nilsson B, Ekdahl KN. The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H<sub>2</sub>O)Bb). *Mol Immunol.* 2008; 45(8):2370-2379.
13. Zewde N, Gorham RD Jr, Dorado A, Morikis D. Quantitative Modeling of the Alternative Pathway of the Complement System. *PLoS One.* 2016;11(3):e0152337.
14. Ballanti E, Perricone C, Greco E, et al. Complement and autoimmunity. *Immunol Res.* 2013;56(2-3):477-491.
15. Horton RM, Ho SN, Pullen JK, Hunt HD, Cai Z, Pease LR. Gene splicing by overlap extension. *Methods Enzymol.* 1993; 217:270-279.
16. Doering CB, Healey JF, Parker ET, Barrow RT, Lollar P. High level expression of recombinant porcine coagulation factor VIII. *J Biol Chem.* 2002;277(41):38345-38349.
17. Fritzinger DC, Hew BE, Thorne M, et al. Functional characterization of human C3/cobra venom factor hybrid proteins for therapeutic complement depletion. *Dev Comp Immunol.* 2009;33(1):105-116.
18. Delignat S, Repesse Y, Gilardin L, et al. Predictive immunogenicity of Refacto AF. *Haemophilia.* 2014;20(4):486-492.
19. Vogel CW, Finnegan PW, Fritzinger DC. Humanized cobra venom factor: structure, activity, and therapeutic efficacy in preclinical disease models. *Mol Immunol.* 2014;61(2):191-203.
20. Gilbert GE, Furie BC, Furie B. Binding of human factor VIII to phospholipid vesicles. *J Biol Chem.* 1990;265(2):815-822.
21. Vogel CW, Fritzinger DC. Cobra venom factor: Structure, function, and humanization for therapeutic complement depletion. *Toxicon.* 2010;56(7):1198-1222.
22. Jacquier-Sarlin MR, Gabert FM, Villiers MB, Colomb MG. Modulation of antigen processing and presentation by covalently linked complement C3b fragment. *Immunology.* 1995;84(1):164-170.
23. Repesse Y, Dasgupta S, Navarrete AM, Delignat S, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S. Mannose-sensitive receptors mediate the uptake of factor VIII therapeutics by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(4):1172-1173.
24. Sorvillo N, Pos W, van den Berg LM, et al. The macrophage mannose receptor promotes uptake of ADAMTS13 by dendritic cells. *Blood.* 2012;119(16):3828-3835.
25. Lenting P, Neels J, van den Berg B, et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1999;274:23734-23739.
26. Saenko E, Yakhyayev A, Mikhailenko I, Strickland D, Sarafanov A. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. *J Biol Chem.* 1999;274:37685-37692.
27. 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.
28. Gangadharan B, Ing M, Delignat S, et al. The C1 and C2 domains of blood coagulation factor VIII mediate its endocytosis by dendritic cells. *Haematologica.* 2017; 102(2):271-281.
29. Bi L, Sarkar R, Naas T, et al. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. *Blood.* 1996;88:3446-3450.
30. Lachmann PJ, Halbwachs L. The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clin Exp Immunol.* 1975; 21(1):109-114.
31. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med.* 1981; 154(3):856-867.
32. Foley JH, Conway EM. Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation. *Circ Res.* 2016;118(9):1392-1408.
33. Rayes J, Roumenina LT, Dimitrov JD, et al. The interaction between factor H and VWF increases factor H cofactor activity and regulates VWF prothrombotic status. *Blood.* 2014;123(1):121-125.
34. Feng S, Liang X, Kroll MH, Chung DW, Afshar-Kharghan V. von Willebrand factor is a cofactor in complement regulation. *Blood.* 2015;125(6):1034-1037.
35. Noone DG, Riedl M, Pluthero FG, et al. Von Willebrand factor regulates complement on endothelial cells. *Kidney Int.* 2016; 90(1):123-134.

# Anti-ADAMTS13 Autoantibodies against Cryptic Epitopes in Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura

Elieen Roose<sup>1</sup> Gestur Vidarsson<sup>2</sup> Kadri Kangro<sup>1</sup> Onno J. H. M. Verhagen<sup>2</sup> Ilaria Mancini<sup>3</sup>  
Linda Desender<sup>1</sup> Inge Pareyn<sup>1</sup> Nele Vandeputte<sup>1</sup> Aline Vandenbulcke<sup>1</sup> Chiara Vendramin<sup>4</sup>  
An-Sofie Schelpe<sup>1</sup> Jan Voorberg<sup>5</sup> Marie-Agnès Azerad<sup>6,7</sup> Laurent Gilardin<sup>8</sup> Marie Scully<sup>4</sup>  
Daan Dierickx<sup>9</sup> Hans Deckmyn<sup>1</sup> Simon F. De Meyer<sup>1</sup> Flora Peyvandi<sup>3,10</sup> Karen Vanhoorelbeke<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Thrombosis Research, IRF Life Sciences, KU Leuven Campus Kulak Kortrijk, Kortrijk, Belgium

<sup>2</sup>Department of Experimental Immunohematology, Sanquin Research and Landsteiner Laboratory, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

<sup>3</sup>Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, and Fondazione Luigi Villa, Milan, Italy

<sup>4</sup>Department of Haematology, University College London Hospital, London, United Kingdom

<sup>5</sup>Department of Plasma Proteins, Sanquin Research and Landsteiner Laboratory, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

<sup>6</sup>Department of Hematology, CHU Brugmann, Brussels, Belgium

<sup>7</sup>Department of Hematology, CHU Liège, Liège, Belgium

<sup>8</sup>Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>9</sup>Department of Hematology, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium

<sup>10</sup>Angelo Bianchi Bonomi Hemophilia and Thrombosis Center, Fondazione IRCCS Ca'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

**Address for correspondence** Karen Vanhoorelbeke, PhD, Laboratory for Thrombosis Research, IRF Life Sciences, KU Leuven Campus Kulak Kortrijk, Etienne Sabbelaan 53, B-8500 Kortrijk, Belgium (e-mail: Karen.Vanhoorelbeke@kuleuven.be).

Thromb Haemost 2018;118:1729–1742.

## Abstract

Immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura (iTTP) is characterized by severe ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13) deficiency, the presence of anti-ADAMTS13 autoantibodies and an open ADAMTS13 conformation with a cryptic epitope in the spacer domain exposed. A detailed knowledge of anti-ADAMTS13 autoantibodies will help identifying pathogenic antibodies and elucidating the cause of ADAMTS13 deficiency. We aimed at cloning anti-ADAMTS13 autoantibodies from iTTP patients to study their epitopes and inhibitory characteristics. We sorted anti-ADAMTS13 autoantibody expressing B cells from peripheral blood mononuclear cells of 13 iTTP patients to isolate anti-ADAMTS13 autoantibody sequences. Ninety-six B cell clones producing anti-ADAMTS13 autoantibodies were identified from which 30 immunoglobulin M (IgM) and 5 IgG sequences were obtained. For this study, we only cloned, expressed and purified the five IgG antibodies. In vitro characterization revealed that three of the five cloned IgG antibodies, TTP73–1, ELH2–1 and TR8C11, indeed recognize ADAMTS13. Epitope mapping showed that antibodies TTP73–1 and TR8C11 bind to the cysteine–spacer

## Keywords

- thrombotic thrombocytopenic purpura
- ADAMTS13
- anti-ADAMTS13 autoantibodies
- cloning
- cryptic epitopes

received  
May 11, 2018  
accepted after revision  
July 18, 2018

© 2018 Georg Thieme Verlag KG  
Stuttgart · New York

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0038-1669459>.  
ISSN 0340-6245.

domains, while the antibody ELH2-1 recognizes the T2-T3 domains in ADAMTS13. None of the antibodies inhibited ADAMTS13 activity. Given the recent findings regarding the open ADAMTS13 conformation during acute iTTP, we studied if the cloned antibodies could recognize cryptic epitopes in ADAMTS13. Interestingly, all three antibodies recognize cryptic epitopes. In conclusion, we cloned three anti-ADAMTS13 autoantibodies from iTTP patients that recognize cryptic epitopes. Hence, these data nicely fit our recent finding that the conformation of ADAMTS13 is open during acute iTTP.

## Introduction

A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13 (ADAMTS13) is an enzyme comprising a metalloprotease domain (M), a disintegrin-like domain (D), 8 thrombospondin type 1 repeats (T1-T8), a cysteine-rich domain (C), a spacer domain (S) and 2 CUB domains.<sup>1</sup> A severe ADAMTS13 deficiency leads to the rare and life-threatening disease, thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP).<sup>2,3</sup> In TTP, ultra-large von Willebrand factor (UL-VWF) multimers are not processed due to the absence of a functional ADAMTS13. UL-VWF multimers spontaneously bind platelets and the resulting micro-thrombi obstruct the capillaries in several organs. ADAMTS13 deficiency is in 5% of the cases caused by mutations in the *ADAMTS13* gene. However, the majority of TTP patients (95%) have immune-mediated TTP (iTTP), due to the presence of anti-ADAMTS13 autoantibodies.<sup>2,3</sup>

A detailed insight into the repertoire of anti-ADAMTS13 autoantibodies in iTTP patients is crucial to identify which anti-ADAMTS13 autoantibodies are pathogenic and cause ADAMTS13 deficiency. Such insights might be helpful in the development of specific immune therapeutic approaches. Many groups have used plasma of iTTP patients and cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies to study the immune response in iTTP patients. Currently, more than 90 individual anti-ADAMTS13 autoantibodies have been cloned via phage display libraries or Epstein-Barr virus immortalization of peripheral B cells or spleen cells.<sup>4-10</sup>

Epitope mapping studies have shown that the immune response in iTTP patients is polyclonal, as antibodies against all domains of ADAMTS13 have been found.<sup>11,12</sup> Remarkably, almost all iTTP patients have antibodies targeting the spacer domain, showing that the spacer domain harbours a dominant immunogenic region.<sup>13-16</sup> Mainly autoantibodies targeting the spacer domain inhibit ADAMTS13 function, and this by targeting an exosite in the spacer domain known to play a role in VWF binding.<sup>17</sup> Based on these findings, inhibition of ADAMTS13 function has long been thought to be the major cause of ADAMTS13 deficiency in iTTP. However, many iTTP plasma samples do not contain inhibitory anti-ADAMTS13 autoantibodies.<sup>18</sup> In addition, recently it was shown that ADAMTS13 antigen levels are often severely decreased in iTTP patients even in the presence of inhibitory anti-ADAMTS13 autoantibodies. Hence, it was concluded that ADAMTS13 clearance

rather than ADAMTS13 inhibition is probably the major pathogenic cause of ADAMTS13 deficiency in iTTP.<sup>18</sup>

A possible explanation for the presence of an immunodominant epitope in the spacer domain evolved from structure-function studies on ADAMTS13 indicating that the spacer and CUB domains interact and by this keep ADAMTS13 in a folded conformation.<sup>19-21</sup> We recently showed that this spacer-CUB interaction is abrogated during acute iTTP, where ADAMTS13 is in an 'open' conformation with a cryptic epitope in the spacer domain exposed.<sup>22</sup> Exposure of cryptic epitopes could either induce an immune response and/or could allow anti-ADAMTS13 autoantibodies recognizing cryptic epitopes to bind. However, it remains unclear whether anti-ADAMTS13 autoantibodies that recognize cryptic epitopes are present in iTTP patients and how they contribute to ADAMTS13 deficiency.

In this article, we isolated, cloned and expressed individual anti-ADAMTS13 autoantibodies from iTTP patients. To further unravel the contribution of individual anti-ADAMTS13 autoantibodies causing ADAMTS13 deficiency or iTTP, we determined the epitope and the inhibitory potential of the cloned antibodies and investigated if they recognize cryptic epitopes.

## Materials and Methods

### Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from whole blood of 13 iTTP patients (see **Table 1**) were isolated using Lymphoprep (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany). All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the committees of all involved institutions (Medical Research Ethics Committee [08/H0716/72], Fondazione IRCCS Ca'Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Hospital Pitié-Salpêtrière, KU Leuven).

### Selection of Anti-ADAMTS13-Specific Single B Cells

Specific anti-ADAMTS13 B cells were selected through fluorescence-activated cell sorting (FACS) as previously described for anti-RhD-specific B cells.<sup>23</sup> Isolated PBMCs from the iTTP patients were labelled with CD19-PerCy7 antibodies, and with fluorescein (F) and phycoerythrin (PE) fluorescently labelled (Bio-Rad, Hercules, California, United States) recombinant human ADAMTS13 (rhADAMTS13) to mark anti-ADAMTS13-specific B cells. Cells positive for CD19-PerCy7, rhADAMTS13-F and rhADAMTS13-PE were selected using a BD FACS Aria II (BD Biosciences, San Jose, California, United States) and seeded

**Table 1** Sorting and identifying anti-ADAMTS13 autoantibody producing B cells from iTTP patients

| Patient no. | ID     | Acute or remission | Immune suppression        | Sorts (n) | Sorted B cells (n) | Anti-ADAMTS13 positive B cells (n) | IgG positive B cells (n) | IgM positive B cells (n) | IgM and IgG positive B cells (n) | Viability (%) |
|-------------|--------|--------------------|---------------------------|-----------|--------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|---------------|
| 1           | BJ     | Acute              | Yes (prednisolone)        | 1         | 480                | 1                                  | 1                        | 0                        | 0                                | ND            |
| 2           | BM     | Remission          | No                        | 2         | 864                | 9                                  | 1                        | 4                        | 4                                | 47–64         |
| 3           | CJ     | Acute              | No                        | 1         | 480                | 4                                  | 0                        | 0                        | 4                                | ND            |
| 4           | ELH    | Remission          | No                        | 2         | 1113               | 11                                 | 3                        | 0                        | 8                                | 39-ND         |
| 5           | HA     | Acute              | No                        | 2         | 840                | 14                                 | 1                        | 7                        | 6                                | 22–61         |
| 6           | LC     | Acute              | Yes (steroids, rituximab) | 1         | 384                | 2                                  | 0                        | 2                        | 0                                | ND            |
| 7           | P      | Acute              | No                        | 1         | 480                | 19                                 | 12                       | 0                        | 7                                | ND            |
| 8           | PI     | Acute              | Yes (steroids)            | 1         | 576                | 1                                  | 0                        | 1                        | 0                                | 6             |
| 9           | SZ     | Acute              | Yes (prednisolone, IVIG)  | 1         | 192                | 6                                  | 5                        | 0                        | 1                                | ND            |
| 10          | TR     | Acute              | Yes (steroids)            | 1         | 960                | 18                                 | 3                        | 11                       | 4                                | 45            |
| 11          | TTP436 | Remission          | No                        | 1         | 768                | 1                                  | 0                        | 1                        | 0                                | 14            |
| 12          | TTP73  | Remission          | Yes (azathioprine)        | 2         | 904                | 9                                  | 1                        | 5                        | 3                                | 32–48         |
| 13          | TTP783 | Remission          | Yes (steroids)            | 1         | 480                | 1                                  | 0                        | 1                        | 0                                | 13            |
|             | Total  |                    |                           | 17        | 8521               | 96                                 | 27                       | 32                       | 37                               |               |

Abbreviations: ADAMTS13, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ID, identity; IgG, immunoglobulin G; IgM, immunoglobulin M; iTTP, immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura; IVIG, intravenous immunoglobulin; ND, not determined; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

Note: PBMCs were isolated from 13 iTTP patients who were either in acute phase or remission (absence of clinical signs: normal platelet count and lactate dehydrogenase [LDH] levels) and who did or did not receive immune suppressive therapy. PBMCs of the iTTP patients were sorted during 1 or 2 sorts into 96-well plates. From a total of 17 sorts, 8,521 wells containing individual sorted B cells were obtained. Of those wells, 96 wells contained anti-ADAMTS13-specific autoantibodies as determined by an ADAMTS13-specific ELISA on the cell supernatant. An IgM- or IgG-specific ELISA showed that these 96 wells contained either only IgG antibodies, only IgM antibodies or both IgM and IgG antibodies. Presence of both IgM and IgG in one well was due to class switching of IgM to IgG antibodies during the 9-day incubation with the irradiated EL4.B5 cells. The percentage of B cells that still produced IgM or IgG antibodies after the 9-day incubation with the irradiated EL4.B5 cells and hence were still viable, was determined for 11 of the 17 sorted samples by making the ratio of the number of cells producing IgG and/or IgM antibodies over the total number of sorted cells (% viability). When 2 sorts were performed, viability is indicated twice.

at 1 cell/well in 96-well flat-bottom microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark), which contained  $10^5$  irradiated (50 Gy) EL4.B5 cells per well in Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM) medium (Lonza, Basel, Switzerland). The IMDM medium was supplemented with 10% foetal calf serum (Bodinco, Alkmaar, The Netherlands), 1% L-glutamine (Invitrogen), 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen), 2.5% T cell supernatant, 20 µg/mL transferrin (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, United States) and 0.5 µg/mL R848 (Enzo Life Sciences, Antwerp, Belgium). Cells were incubated for 9 days at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> to allow B cells to proliferate and produce antibodies.

#### Anti-ADAMTS13 Antibodies

The mouse anti-human ADAMTS13 antibodies 3H9,<sup>21,24</sup> 20A5,<sup>21,25</sup> 5C11<sup>21,25</sup> and 1C4<sup>22</sup> are in-house developed murine monoclonal antibodies. Anti-ADAMTS13 antibody 3H9 has an epitope in the metalloprotease domain, inhibits ADAMTS13 activity in vitro and in vivo<sup>21,24,26</sup> and is an antibody that is ideally suited to capture ADAMTS13 from plasma or expression

medium in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).<sup>21,22</sup> Antibody 20A5 targets the T8 domain, increases ADAMTS13 activity and is able to capture ADAMTS13.<sup>21,25–27</sup> Anti-ADAMTS13 antibody 5C11 has an epitope in the T2 domain and is a non-inhibitory anti-ADAMTS13 antibody that is ideally suited to capture ADAMTS13 in ELISA.<sup>21,25,26,28,29</sup> Anti-ADAMTS13 antibody 1C4 recognizes a cryptic epitope in the spacer domain (R568, R660, Y661 and Y665) in ADAMTS13. Only when the conformation of ADAMTS13 is changed by direct coating of ADAMTS13 or by addition of, for example, the activating anti-CUB1 antibody 17G2,<sup>22</sup> the cryptic epitope of antibody 1C4 becomes exposed. Antibody 1C4 is a non-inhibitory antibody.

Human anti-human ADAMTS13 autoantibodies II-1 and I-9 are two autoantibodies isolated from iTTP patients that both target the residues R568, R660, Y661 and Y665 in the spacer domain, while antibody II-1 also targets residue F592.<sup>6,7,14,16</sup> Antibody II-1 is a strong inhibitor while antibody I-9 is a weak inhibitor of ADAMTS13 function in vitro.<sup>6</sup>

### Selection of Specific Anti-ADAMTS13 B Cell Clones and Determination of Antibody Isotype

B cell supernatant of the sorted B cells was tested in ELISA to identify B cells producing anti-ADAMTS13 autoantibodies. The murine anti-ADAMTS13 monoclonal antibody 3H9 (5 µg/mL) was coated<sup>21,24</sup> and expression medium containing rhADAMTS13<sup>22</sup> was added. Next, 50 µL of supernatant from the cultured B cells was added. Human anti-ADAMTS13 autoantibodies binding to the captured rhADAMTS13 were detected using biotin-labelled rabbit anti-human immunoglobulin G (IgG) + IgM (1/10,000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, United States) followed by horseradish peroxidase (HRP)-labelled Pierce High Sensitivity Streptavidin (1/10,000; Invitrogen). Colorimetric development was performed by using o-phenylenediamine and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The reaction was stopped using 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and absorbance was measured at 490 nm. Cells from which the supernatant showed specific binding to ADAMTS13 were harvested and 15 µL of Trizol (Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium) was added. In parallel, also the IgG or IgM isotype of the anti-ADAMTS13-specific autoantibodies produced by the B cells was determined using ELISA as described.<sup>30</sup> The viability of the B cells was determined by making the ratio of the number of cells producing IgG or IgM antibodies over the total number of sorted cells that were tested in ELISA.

### Determination of the Variable Sequences of Heavy and Light Chains

To isolate and determine the variable sequences of both heavy (VH) and light chains (VL) of the antibodies, sequences were amplified as described previously.<sup>23,31</sup> Messenger ribonucleic acid from the Trizol-treated cells was isolated and was transcribed into complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) by a 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) polymerase chain reaction (PCR) using a SMARTER RACE cDNA amplification and Advantage 2 polymerase kit (Clontech, Palo Alto, California, United States). To increase the amount and specificity of the amplified cDNA, a nested PCR was performed. Depending on the isotype(s) that was/were determined through ELISA, 3 or 4 PCR reactions were performed per B cell clone, one or two reactions (γ and/or μ) to amplify the VH and always two reactions (κ and λ) to amplify the VL. As forward primers, a mixture present in the SMARTER kit was used, while primers complementary to the constant region of either chain were used as reverse primers. PCR products were sent to GATC (GATC Biotech AG, Constance, Germany) for sequencing. Sequences were searched for homologous germline genes using the ImMunoGeneTics (IMGT) database (<http://www.imgt.org>).

### Cloning, Expression and Purification of the Anti-ADAMTS13 Autoantibodies

The five antibody sequences derived from an IgG antibody were selected for cloning. The variable sequences including the leader sequence of both heavy and light chain were codon optimized using the GeneArt Algorithm (Invitrogen),<sup>32–35</sup> a Kozak sequence (GCCACC) and restriction cleavage sites

(*Hind*III and *Nhe*I or *Xho*I for the heavy and κ light chain, respectively) were added and plasmids were ordered. After restriction digestion, the variable antibody sequences were ligated in plasmids containing the γ1 or κ constant region with an *Eco*RI restriction site at the end. The complete λ light chain (variable and constant region) was ordered as such flanked by *Hind*III and *Eco*RI restriction sites. The complete antibody heavy and light chains were eventually ligated into the pcDNA3.1 (+) expression plasmid by restriction digestion with *Hind*III and *Eco*RI. Next, HEK293 F cells (Invitrogen) were transiently transfected with the plasmids as previously described.<sup>36</sup> Antibodies were purified using Sepharose Protein G 4 Fast Flow column chromatography (GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, United States). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by Instant Blue Protein Gel staining (Westburg, Leusden, The Netherlands) was used to evaluate purity.

### In Vitro Characterization of Cloned Anti-ADAMTS13 Autoantibodies

#### Binding of Cloned Autoantibodies to ADAMTS13

To check whether the cloned autoantibodies bind to ADAMTS13, the anti-ADAMTS13-specific ELISA as described above was used with some modifications. After coating a 96-well microtiter plate with the antibody 3H9 (5 µg/mL),<sup>21,24</sup> pure plasma from a normal human plasma pool (NHP) was added in a 1 in 2 dilution series, as a source of ADAMTS13 (1 µg/mL). Next, biotinylated cloned human autoantibodies (5 µg/mL) were added. The anti-ADAMTS13 autoantibodies II-1 and I-9 were also biotinylated and were added as a positive control.<sup>7,14,16</sup> Next, HRP-labelled streptavidin (1/10,000; Sigma Aldrich) was added. Colorimetric development and absorbance measurement was performed as described above. The optical density (OD) value corresponding to the binding of II-1 to captured ADAMTS13 was set as 1 and was used to calculate relative OD values.

#### Epitope Mapping

The domains to which the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies bind were determined by ELISA by using previously described ADAMTS13 truncation (M, MD, MDT, MDTCS, T5, T6, T7, T8, T2C2) and deletion mutants (delT2, delT3, delT4, delT5, delT8, delCUB1).<sup>21</sup> First, the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies were mapped against MDTCS or T2C2. Here, a 96-well plate was coated with the antibodies 3H9 (anti-M)<sup>21,24</sup> and 5C11 (anti-T2)<sup>21,25</sup> to test TTP73–1 and TR8C11 or 20A5 (anti-T8)<sup>21,25</sup> to test ELH2–1 (5 µg/mL) to which MDTCS or T2C2 (15 nM) was added, respectively, in a 1 in 2 dilution series. Next, the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies were added and bound antibodies were detected using HRP-labelled rabbit anti-human IgG and IgM antibodies. To further refine the epitope of the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies, microtiter plates were coated with the antibody 3H9 (5 µg/mL)<sup>21,24</sup> and expression medium or 15 nM of the different truncation and deletion mutants was added in a 1 in 2 dilution series followed by incubation with the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies (1.5 µg/mL). Bound antibodies were detected using

HRP-labelled rabbit anti-human IgG and IgM antibodies. Colorimetric development and absorbance measurement was performed as described above. Relative OD values were used to express the binding of antibody ELH2-1: binding to wild-type ADAMTS13 was used as a reference and set as a relative OD of 1.

### Western Blot

To identify which of the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies recognize a denatured or linear epitope in ADAMTS13, SDS-PAGE and western blot was performed. A 7.5% SDS-PAGE gel was run with 50 nM of rhADAMTS13 under non-reducing and reducing conditions. After transferring the samples to a Rotipolyvinylidene fluoride membrane (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), the membrane was blocked with 3% milk in phosphate-buffered saline. Next, the membrane was incubated with the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies (1.5 µg/mL) and bound antibodies were detected using HRP-labelled rabbit anti-human IgG and IgM antibodies. For visualization, the membrane was incubated for 5 minutes with 2 mL of the Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit (Acros Organics, Geel, Belgium) and illuminated in a Fujifilm LAS-4000 device (Fujifilm, Tokyo, Japan). Incubation with only secondary antibody HRP-labelled rabbit anti-human IgG and IgM was used as negative control. As a positive control, the anti-ADAMTS13 autoantibodies II-1 and I-9 were used.<sup>6,7,14,16</sup>

### Influence of Cloned Anti-ADAMTS13 Autoantibodies on ADAMTS13 Activity

To test the inhibitory potential of the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies, the FRET-S-VWF73 (Peptides International, Louisville, Kentucky, United States) assay was used.<sup>21,37</sup> The cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies (10 µg/mL) were incubated with 0.03 µg/mL of plasma ADAMTS13 (from NHP). A standard curve containing 0.005, 0.01, 0.02, 0.025 and 0.03 µg/mL plasma ADAMTS13 was used. The anti-ADAMTS13 autoantibodies II-1 and I-9 were used as controls.<sup>6,7,14,16</sup>

### Capturing ADAMTS13 from NHP by Anti-ADAMTS13 Autoantibodies

To investigate whether the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies recognize cryptic epitopes in ADAMTS13, we investigated whether they could capture ADAMTS13 from NHP. First, a 96-well microtiter plate was coated with the cloned human anti-ADAMTS13 autoantibodies (5 µg/mL). The autoantibodies II-1 and I-9 were included as a control.<sup>6,7,14,16</sup> Next, pure plasma from NHP was added in a 1 in 2 dilution series. Bound ADAMTS13 was detected with biotinylated antibody 3H9 (5 µg/mL). Finally, HRP-labelled streptavidin (1/10,000; Sigma Aldrich) was added. Colorimetric development and absorbance measurement was performed as described above. Relative OD values were calculated using the OD value measured for antibody II-1 that was set as 1.

### Binding of Cloned Anti-ADAMTS13 Autoantibodies to Coated rhADAMTS13

To investigate whether the cryptic epitopes of the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies can be exposed by coating of ADAMTS13, a 96-well microtiter plate was directly coated

with rhADAMTS13 (15 nM). Next, the autoantibodies (100 µg/mL) were added in a 1 in 2 dilution series. Bound antibodies were detected using HRP-labelled rabbit anti-human IgG and IgM antibodies. Colorimetric development and absorbance measurement was performed as described above. The autoantibodies II-1 and I-9 were used as positive controls.<sup>6,7,14,16</sup> The OD value of the binding of antibody II-1 to rhADAMTS13 was used as a reference and set as 1 to calculate relative OD values.

### Exposure of Cryptic Epitopes by Capturing ADAMTS13

To be able to explain selection of anti-ADAMTS13 autoantibodies against cryptic epitopes, the conformation of ADAMTS13 had to be changed during the selection of specific anti-ADAMTS13 B cell clones. Therefore, we finally investigated if cryptic epitopes become exposed in ADAMTS13 when captured by murine anti-ADAMTS13 antibody 3H9. Therefore, a 96-well microtiter plate was coated with the murine anti-ADAMTS13 antibody 1C4<sup>22</sup> or 3H9 (5 µg/mL).<sup>21,24</sup> After blocking, pure NHP was added in a 1 in 2 dilution series. Bound ADAMTS13 was detected with the biotinylated antibodies 3H9 or 1C4, respectively, and HRP-labelled streptavidin (1/10,000; Sigma Aldrich). Colorimetric development and absorbance measurement was performed as described above. Relative OD values were calculated by putting the OD value of 1C4 binding to 3H9 captured ADAMTS13 as 1.

## Results

### Isolation of Anti-ADAMTS13-Specific B Cell Clones from iTTP Patients

We aimed at cloning anti-ADAMTS13 autoantibodies from iTTP patients to further expand the knowledge on epitopes and inhibitory characteristics of anti-ADAMTS13 autoantibodies. This will help to further elucidate how anti-ADAMTS13 autoantibodies cause ADAMTS13 deficiency. To do so, anti-ADAMTS13 autoantibody expressing B cells were sorted from PBMCs of 13 iTTP patients (►Table 1) and the VH and VL sequences of the antibodies expressed by the selected B cells were determined. We previously have shown that this technology was successful to isolate both IgG and IgM expressing anti-RhD-specific B cells from peripheral blood of donors hyperimmunized with D<sup>+</sup> erythrocytes.<sup>23,31</sup> The PBMCs of the 13 iTTP patients were used in 1 or 2 sorts, resulting in a total of 17 sorted samples. After sorting, 8,521 B cells were retrieved (►Table 1) and were incubated for 9 days in the presence of EL4.B5 cells to induce proliferation of the B cells and production of the antibodies. Cell supernatant of all wells was tested for the presence of anti-ADAMTS13 autoantibodies using an ELISA where rhADAMTS13 was captured on the antibody 3H9. This assay revealed that 96 of the 8,521 wells contained B cells that produced detectable anti-ADAMTS13 autoantibodies (1–19 positive wells per patient; ►Table 1). The same supernatant was also tested in ELISA to determine the IgM or IgG isotype. Of the 96 B cell clones producing anti-ADAMTS13 autoantibodies, 27 were of the IgG isotype, 32 of the IgM isotype and 37 of both the IgG and IgM isotype. B cells producing both IgG and IgM antibodies originate from IgM

producing cells that class switched to IgG producing cells during the incubation with the EL4.B5 cells.<sup>31</sup> The high number of isolated IgM expressing anti-ADAMTS13-specific B cells from PBMCs of iTTP patients is in line with previous findings, where the frequency of circulating IgM expressing antigen-specific B cells in peripheral blood was also high.<sup>31,38</sup> The viability of the B cells was tested on 11 of the 17 sorted samples by screening for the presence of IgM or IgG in all sorted wells (and not only in the anti-ADAMTS13 autoantibody positive wells). These data show a great variability in viability of the B cells between the patient samples (►Table 1). In some sorted samples, more than 90% of the wells did not contain IgM or IgG antibodies implying that more than 90% of the cells died during incubation or that the cells could not secrete antibodies, while in other samples only 40% of the wells did not contain IgM or IgG antibodies. Hence, the delicate process of isolating, freezing, storing and thawing of the samples greatly influences the viability of the cells.

### Antibody Sequence Determination of Isolated B Cell Clones

In a second step, we isolated RNA, performed 5' RACE PCR and nested PCR to obtain the sequences of the antibody variable regions from the 96 anti-ADAMTS13 autoantibody producing B cell clones. The DNA sequence of the variable regions of both heavy and light chains from 35 antibodies of 6 patients was obtained (►Table 2). From the other 61 clones, no DNA sequences for (both) heavy and light chains could be retrieved, likely because not enough good quality RNA could be isolated from the B cells. Thirty of the 35 variable heavy chain antibody sequences were retrieved from IgM producing B cells, while 5 variable heavy chain DNA sequences belonged to an IgG producing B cell clone (►Table 2). For the variable fragments of the light chains, 25 DNA sequences encoded for a kappa light chain and 10 DNA sequences encoded a light chain of the lambda sub-type (►Table 2). All DNA sequences were analysed using the IMGT database (<http://www.imgt.org>) to identify their corresponding human germline sequence. Sixteen different immunoglobulin heavy chain variable (IGHV) germline sequences were identified in the antibody sequences from the IgM isotype (►Table 2). Remarkably, one-third (10 out of 30) of the IGHV sequences were derived from the same germline sequence, namely, IGHV1-69. This is in line with previous studies in which several different germline sequences were identified, but antibodies encoded by this IGHV1-69 germline sequence were isolated multiple times in the majority of the investigated iTTP patients.<sup>4,5,7,9,16</sup> In the IgM antibody sequences, replacement (R) or silent (S) mutations in the framework or complementarity determining regions of the antibody sequences were rather limited. Indeed, in 17 of the 30 antibody sequences (57%) no single somatic hypermutation (SHM) was found in both the VH and VL sequence (►Table 2), while 13 sequences did show SHM (►Table 2). All five antibody sequences encoding an IgG antibody (TTP73-1, ELH2-1, TR8C11, BM4H3, ELH5B9) were derived from different germlines (►Table 2). Also, here one antibody sequence (TR8C11) was derived from the IGHV1-69 germline. No R or S mutations were found for the antibody sequences TR8C11 and BM4H3 while the antibody sequences TTP73-1, ELH2-1 and

ELH5B9 contain up to 6 SHM (►Table 2). For this study, we selected the 5 IgG antibody sequences (TTP73-1, ELH2-1, TR8C11, BM4H3, ELH5B9; ►Table 3), as anti-ADAMTS13 autoantibodies of the IgG isotype have been found in 80 to 97% of the iTTP patients while only 10% of the patients have detectable IgM anti-ADAMTS13 autoantibodies in their plasma.<sup>39,40</sup>

### Cloning and Production of Specific Anti-ADAMTS13 IgG Autoantibodies

To characterize the 5 IgG antibodies, we first cloned and expressed the antibodies. The sequences encoding the VH and VL of the 5 selected anti-ADAMTS13 IgG autoantibodies (►Table 3) were first codon optimized and chemically synthesized. Next, the VH and kappa VL sequences were cloned in a plasmid containing the constant IgG<sub>1</sub> or kappa sequence, respectively. Finally, the complete antibody heavy (IgG<sub>1</sub>) and light chain sequences (kappa or lambda) were cloned in a pcDNA3.1 (+) expression plasmid. Thereafter, HEK293 F suspension cells were transfected with the expression plasmids encoding TTP73-1, ELH2-1, TR8C11, BM4H3 and ELH5B9 antibodies.<sup>36</sup> Antibodies were purified and SDS-PAGE analysis showed that both heavy and light chains were efficiently expressed for all antibodies, except for antibody ELH5B9 where no antibody chains were detected indicating a secretion deficiency (►Fig. 1A). Three of the cloned antibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 did retain their binding activity as they were able to bind to ADAMTS13 captured by 3H9 in ELISA (►Fig. 1B), while antibody BM4H3 did not (►Fig. 1B). The previously cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies II-1 and I-9, were used as positive controls (►Fig. 1B).<sup>6,14-16</sup>

In conclusion, we generated three novel anti-ADAMTS13 autoantibodies from iTTP patients.

### Epitope Mapping and Inhibitory Capacity of Novel Cloned Anti-ADAMTS13 Autoantibodies

We next determined the epitopes and the inhibitory potential of the anti-ADAMTS13 autoantibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11. Initial screening revealed that antibodies TTP73-1 and TR8C11 are directed against the N-terminal part (MDTCS), while ELH2-1 targets the C-terminal part (T2C2) of ADAMTS13 (data not shown). Using a series of ADAMTS13 truncation (M, MD, MDT, MDTCS, T5, T6, T7, T8 and T2C2; ►Fig. 2A) and deletion mutants (delT2, delT3, delT4, delT5, delT8 and delCUB1; ►Fig. 2A),<sup>21</sup> we further refined the epitope mapping. Antibodies TTP73-1 and TR8C11 only recognized MDTCS and not M, MD or MDT, demonstrating that both antibodies are directed against the cysteine-spacer domains (►Figs. 2B and C). Antibody ELH2-1 bound to the C-terminal truncation or deletion mutants T5, T6, T7, T8, delT4, delT5, delT8 and delCUB1, while binding to delT2 and delT3 was abrogated, showing that ELH2-1 recognized the T2-T3 domains of ADAMTS13 (►Fig. 2D). Western blot revealed that the autoantibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 recognize denatured ADAMTS13 under non-reducing conditions. Although detection by TR8C11 was relatively weak, we could define a light band in contrast to our negative control (►Fig. 2E). As expected, the control autoantibodies II-1 and I-9 recognized ADAMTS13 in western blot under non-reducing conditions

**Table 2** Overview of 35 anti-ADAMTS13 autoantibody sequences retrieved from the sorted B cells

| B cell ID | Heavy chain |                |            | FR             |  | CDR1 + CDR2 |   | Length CDR3 | Light chain |              |            | FR |   | CDR1 + CDR2 |   | Length CDR3 |
|-----------|-------------|----------------|------------|----------------|--|-------------|---|-------------|-------------|--------------|------------|----|---|-------------|---|-------------|
|           | Isotype     | V germline     | J germline | D germline     |  | R           | S |             | Isotype     | V germline   | J germline | R  | S | R           | S |             |
| HA-3      | μ           | IGHV1-18*01F   | IGHJ2*01F  | IGHD2-21*02F   |  | 4           | 0 | 1           | κ           | IGKV3-20*01F | IGKJ4*01F  | 1  | 1 | 0           | 1 | 9           |
| TR6-B11   | μ           | IGHV1-2*02F    | IGHJ6*02F  | IGHD2-2*01F    |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV1-12*01F | IGKJ4*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TRP783-G3 | μ           | IGHV1-2*02F    | IGHJ3*02F  | IGHD2-15*01F   |  | 1           | 0 | 0           | κ           | IGKV4-1*01F  | IGKJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| HA3-C5    | μ           | IGHV1-69*01F   | IGHJ4*02F  | IGHD5-12*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV3-20*01F | IGKJ4*01F  | 1  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TR4-F9    | μ           | IGHV1-69*01F   | IGHJ5*02F  | IGHD6-19*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV4-1*01F  | IGKJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TR7-F5    | μ           | IGHV1-69*01F   | IGHJ5*02F  | IGHD7-27*01F   |  | 0           | 0 | 0           | λ           | IGLV3-25*03F | IGLJ2*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 10          |
| TRP73-5   | μ           | IGHV1-69*01F   | IGHJ5*02F  | IGHD3-22*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV2-28*01F | IGKV5*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| BM2-D8    | μ           | IGHV1-69*02F   | IGHJ3*02F  | IGHD1-26*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV2-28*01F | IGKJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| BM5-B12   | μ           | IGHV1-69*02F   | IGHJ4*02F  | IGHD3-22*01F   |  | 0           | 0 | 0           | λ           | IGLV3-21*02F | IGLJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 11          |
| BM5-G6    | μ           | IGHV1-69*02F   | IGHJ4*02F  | IGHD2-8*01F    |  | 0           | 0 | 0           | λ           | IGLV3-1*01F  | IGLJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| HA3-B1    | μ           | IGHV1-69*02F   | IGHJ4*02F  | IGHD3-22*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV2-28*01F | IGKJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TRP73-3   | μ           | IGHV1-69*02F   | IGHJ6*02F  | IGHD3-22*01F   |  | 0           | 1 | 0           | κ           | IGKV2-28*01F | IGKJ5*01F  | 0  | 1 | 0           | 0 | 9           |
| TR4-G8    | μ           | IGHV1-69*06F   | IGHJ4*02F  | IGHD5-24*01    |  | 0           | 0 | 1           | λ           | IGLV3-25*03F | IGLJ3*02F  | 1  | 0 | 0           | 0 | 10          |
| BM3-F5    | μ           | IGHV2-5*02F    | IGHJ4*02F  | IGHD2-15*01F   |  | 3           | 2 | 2           | λ           | IGLV1-51*01F | IGLJ3*01F  | 3  | 1 | 2           | 0 | 11          |
| TRP73-8   | μ           | IGHV3-07*01F   | IGHJ4*02F  | IGHD6-13*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV4-1*01F  | IGKJ3*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 8           |
| TRP73-2   | μ           | IGHV3-20*01F   | IGHJ6*02F  | IGHD2-2*02F    |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV2-28*01F | IGKJ4*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| HA3-F9    | μ           | IGHV3-21*01F   | IGHJ4*02F  | IGHD3-22*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV4-1*01F  | IGKJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TRP73-18  | μ           | IGHV3-23*01    | IGHJ4*03F  | IGHD1-26*01F   |  | 0           | 0 | 0           | λ           | IGLV1-51*01F | IGLJ1*01F  | 5  | 0 | 0           | 0 | 11          |
| BM2-C5    | μ           | IGHV3-30       | IGHJ5*02F  | IGHD3-9*01F    |  | 0           | 0 | 1           | κ           | IGKV1-13*02F | IGKJ4*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TR9-B12   | μ           | IGHV3-33*02F   | IGHJ6*02F  | IGHD6-19*01F   |  | 3           | 0 | 0           | κ           | IGKV1-16*02F | IGKJ2-02F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TR9-F7    | μ           | IGHV3-53*01F   | IGHJ6*03F  | IGHD6-13*01F   |  | 4           | 7 | 6           | κ           | IGKV6-21*02F | IGKJ4*01F  | 2  | 1 | 2           | 0 | 9           |
| TR6-A7    | μ           | IGHV4-30-2*01F | IGHJ4*02F  | IGHD3-3*01F    |  | 0           | 0 | 0           | λ           | IGLV2-23*01F | IGLJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 10          |
| TR4-A8    | μ           | IGHV4-31*03F   | IGHJ6*02F  | IGHD3-16*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV1-39*01F | IGKJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TR9-D7    | μ           | IGHV4-31*03F   | IGHJ6*02F  | IGHD3-10*01F   |  | 0           | 0 | 0           | λ           | IGLV3-25*03F | IGLJ3*02F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 10          |
| TRP73-6   | μ           | IGHV4-31*03F   | IGHJ4*02F  | IGHD1-26*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV1-8*01F  | IGKJ4*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TR9-B7    | μ           | IGHV4-39*01F   | IGHJ4*02F  | IGHD3-22*01F   |  | 0           | 0 | 0           | λ           | IGLV1-51*01F | IGLJ3*02F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 12          |
| BM5-H1    | μ           | IGHV4-61*02F   | IGHJ6*02F  | IGHD6-13*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV3-20*01F | IGKJ5*01F  | 4  | 1 | 1           | 0 | 10          |
| HA4-D6    | μ           | IGHV4-61*04F   | IGHJ5*01F  | IGHD3-22*01F   |  | 9           | 3 | 4           | κ           | IGKV1-39*01F | IGKJ2*01F  | 4  | 3 | 0           | 0 | 8           |
| HA4-E7    | μ           | IGHV6-1*01F    | IGHJ6*02F  | IGHD3-22*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV1-39*01F | IGKJ4*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 9           |
| TR5-D8    | μ           | IGHV6-1*01F    | IGHJ6*03F  | IGHD6-19*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV3-15*01F | IGKJ4*01F  | 7  | 2 | 2           | 1 | 10          |
| TRP73-1   | γ           | IGHV4-39*01F   | IGHJ3*02F  | IGHD3-22*01F   |  | 0           | 0 | 1           | κ           | IGKV1-39*01F | IGKJ2*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 11          |
| ELH2-1    | γ           | IGHV4-31*03F   | IGHJ6*02F  | IGHD2-15*01F   |  | 4           | 0 | 2           | κ           | IGKV3-11*01F | IGKJ3*01F  | 0  | 1 | 0           | 0 | 7           |
| TR8C11    | γ           | IGHV1-69*01F   | IGHJ4*02F  | IGHD6-13*01F   |  | 0           | 0 | 0           | λ           | IGLV3-21*02F | IGLJ2*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 11          |
| BM4H3     | γ           | IGHV4-59*08F   | IGHJ4*02F  | IGHD3-22*01F   |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV4-1*01F  | IGKJ1*01F  | 0  | 0 | 0           | 0 | 10          |
| ELH5B9    | γ           | IGHV1-18*01F   | IGHJ4*02F  | Not identified |  | 0           | 0 | 0           | κ           | IGKV1-5*03F  | IGKJ1*01F  | 2  | 0 | 1           | 1 | 9           |

Abbreviations: ADAMTS13, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13; ID, identity; iTTP, immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura.

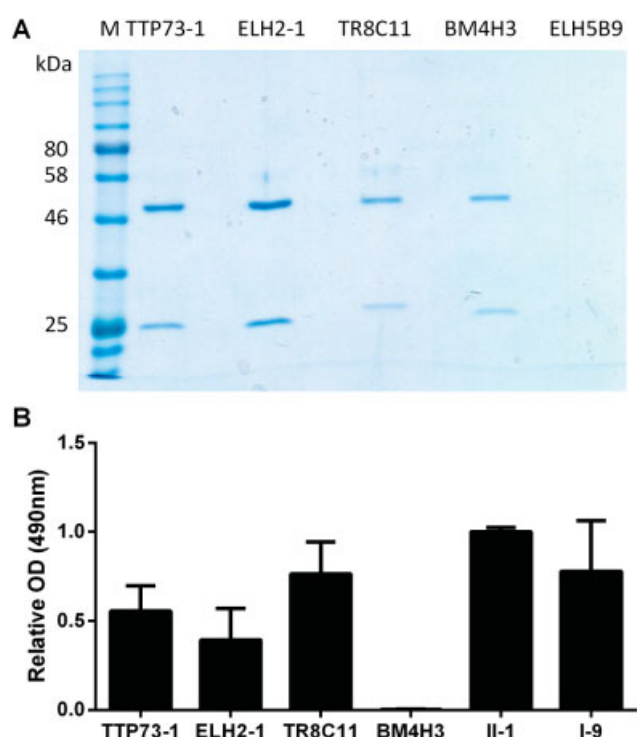
Note: Isotype (γ or μ for heavy and λ or κ for light chain), V, D and J germline sequence, replacement (R) or silent (S) mutations in the framework (FR) regions or complementarity determining regions (CDR) 1 and 2, and the length of the CDR3 are given for both heavy and light chain sequences of the 35 anti-ADAMTS13 autoantibodies isolated from B cells of iTTP patients.

**Table 3** Alignment of the 5 antibody variable sequences (TTP73–1, ELH2–1, TR8C11, BM4H3 and ELH5B9) of the IgG isotype with their corresponding germline sequence

| Heavy Chain  |                              |      |      |                    |      |      |                                            |                        |             |
|--------------|------------------------------|------|------|--------------------|------|------|--------------------------------------------|------------------------|-------------|
|              | FR1                          | CDR1 | FR2  | CDR2               | FR3  | CDR3 | FR4                                        |                        |             |
| IGHV1-18*01  | QVQLVQSGA EVKKP GASVKVSCKAS  | GYTF | TSYG | ISWVQAP GQGLEWNGW  | ISAY | NGNT | NVAQKIQ G RVTMTDTST STAYMELSLRS DDTAVIYC   | ARERPASFYDFWSGYLLNDY   | CGQGTLTVTSS |
| ELH5-B9      | QVQLVQSGA EVKKP GSSVKVSCKAS  | GGTF | SSYA | ISWVQAP GQGLEWNGG  | IIPi | FGTA | NVAQKFP G RVTITADEST STAYMELSSIRS EDTAVIYC | ARVYSSSWLDY            | WGQGTLTVTSS |
| TR8-C11      | QVQLVQSGA EVKKP GSSVKVSCKAS  | GGTF | SSYA | ISWVQAP GQGLEWNGG  | IIPi | FGTA | NVAQKFP G RVTITADEST STAYMELSSIRS EDTAVIYC | ARVYSSSWLDY            | WGQGTLTVTSS |
| IGHV4-31*03  | QVQLQESGP GLVKKP SQTLSLTCTVS | GGSI | SGGY | WSWIRQHP GKLEWITGY | IYYS | GST  | YNNPSIK S RVTISVDTSK NQFSLKLSVTA ADTAVIYC  | ARNSPTRYCSGGTCYVYYGMDV | WGQGTLTVTSS |
| ELH2-1       | QVQLQESGP GLVKKP SETLSLTCTVS | GGSI | SSSY | WSWIRQHP GKLEWITGS | IYYS | GST  | YNNPSIK S RVTISVDTSK NQFSLKLSVTA ADTAVIYC  | ARNSPTRYCSGGTCYVYYGMDV | WGQGTLTVTSS |
| IGHV4-39*01  | QVQLQESGP GLVKKP SETLSLTCTVS | GGSI | SSSY | WSWIRQHP GKLEWITGS | IYYS | GST  | YNNPSIK S RVTISVDTSK NQFSLKLSVTA ADTAVIYC  | ARNSPTRYCSGGTCYVYYGMDV | WGQGTLTVTSS |
| TTP73-1      | QVQLQESGP GLVKKP SETLSLTCTVS | GGSI | SSSY | WSWIRQHP GKLEWITGS | IYYS | GST  | YNNPSIK S RVTISVDTSK NQFSLKLSVTA ADTAVIYC  | ARNSPTRYCSGGTCYVYYGMDV | WGQGTLTVTSS |
| IGHV4-59*08  | QVQLQESGP GLVKKP SETLSLTCTVS | GGSI | SSSY | WSWIRQHP GKLEWITGS | IYYS | GST  | YNNPSIK S RVTISVDTSK NQFSLKLSVTA ADTAVIYC  | ARNSPTRYCSGGTCYVYYGMDV | WGQGTLTVTSS |
| BM4-H3       | QVQLQESGP GLVKKP SETLSLTCTVS | GGSI | SSSY | WSWIRQHP GKLEWITGS | IYYS | GST  | YNNPSIK S RVTISVDTSK NQFSLKLSVTA ADTAVIYC  | ARNSPTRYCSGGTCYVYYGMDV | WGQGTLTVTSS |
| Light chain  |                              |      |      |                    |      |      |                                            |                        |             |
|              | FR1                          | CDR1 | FR2  | CDR2               | FR3  | CDR3 | FR4                                        |                        |             |
| IGKV1-39*01F | DIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCRAS  | QSI  | SSY  | LNWYQQKPKAPKLLIY   | AA   | S    | SLQSGVP S RFGSG SG TDFTLTISSIQP EDFATYIC   | QOSYSTPYPT             | FGQGTKLEI   |
| TTP73-1      | DIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCRAS  | QSI  | SSY  | LNWYQQKPKAPKLLIY   | AA   | S    | SLQSGVP S RFGSG SG TDFTLTISSIQP EDFATYIC   | QOSYSTPYPT             | FGQGTKLEI   |
| IGKV1-5-03F  | DIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCRAS  | QSI  | SSW  | LNWYQQKPKAPKLLIY   | KA   | S    | SLQSGVP S RFGSG SG TDFTLTISSIQP EDFATYIC   | QOSYSTPYPT             | FGQGTKLEI   |
| ELH5-B9      | DIQMTQSPSSLSASV GDRVITTCRAS  | QSI  | SSW  | LNWYQQKPKAPKLLIY   | KA   | S    | SLQSGVP S RFGSG SG TDFTLTISSIQP EDFATYIC   | QOSYSTPYPT             | FGQGTKLEI   |
| IGHV3-11*01F | EIVLTQSPATLSLSP GERATISCRAS  | QSV  | SSY  | LNWYQQKPKAPKLLIY   | DA   | S    | NRATGIP A RFGSG SG TDFTLTISSIQP EDFATYIC   | QOSYSTPYPT             | FGQGTKLEI   |
| ELH2-1       | EIVLTQSPATLSLSP GERATISCRAS  | QSV  | SSY  | LNWYQQKPKAPKLLIY   | DA   | S    | NRATGIP A RFGSG SG TDFTLTISSIQP EDFATYIC   | QOSYSTPYPT             | FGQGTKLEI   |
| IGHV4-1*01F  | DIQMTQSPSSLSASV GERATINCKSS  | QSV  | SSY  | LNWYQQKPKAPKLLIY   | DA   | S    | NRATGIP A RFGSG SG TDFTLTISSIQP EDFATYIC   | QOSYSTPYPT             | FGQGTKLEI   |
| BM4-H3       | DIQMTQSPSSLSASV GERATINCKSS  | QSV  | SSY  | LNWYQQKPKAPKLLIY   | DA   | S    | NRATGIP A RFGSG SG TDFTLTISSIQP EDFATYIC   | QOSYSTPYPT             | FGQGTKLEI   |
| IGHV3-21*02F | SYVLTQPPS VSVAP GQTARITCGGN  | NIG  | SKS  | VHWYQQKPKAPKLLIY   | DD   | S    | DRPSGIP E RFGSGN SG NTAFLTISRVEA GDEADYIC  | QVWDSDDHVV             | FGQGTKLEI   |
| TR8-C11      | SYVLTQPPS VSVAP GQTARITCGGN  | NIG  | SKS  | VHWYQQKPKAPKLLIY   | DD   | S    | DRPSGIP E RFGSGN SG NTAFLTISRVEA GDEADYIC  | QVWDSDDHVV             | FGQGTKLEI   |

Abbreviation: IgG, immunoglobulin G.

Note: Replacement mutations are indicated with letters, silent mutations are indicated with \* and identical codon usage is represented with –.



**Fig. 1** The cloned antibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 bind to ADAMTS13. (A) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions of the newly cloned antibodies TTP73-1, ELH2-1, TR8C11, BM4H3 and ELH5B9. (B) Binding of biotinylated TTP73-1, ELH2-1, TR8C11, BM4H3, II-1 and I-9 to ADAMTS13 captured from normal human plasma pool (NHP) by 3H9 (5 µg/mL) coated on a 96-well microtiter plate. Detection of the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies was done with horseradish peroxidase (HRP)-labelled streptavidin. The optical density (OD) value corresponding to the binding of antibody II-1 was set as 1 to calculate relative OD values.

(►Fig. 2E). However, TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 did not detect ADAMTS13 under reducing conditions (data not shown).

The effect of the autoantibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 on ADAMTS13 activity was tested in the FRET-VWF73 assay. Autoantibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 did not inhibit ADAMTS13 activity (►Fig. 2F). As expected, also autoantibody I-9 could not inhibit ADAMTS13 activity at the concentration used (►Fig. 2F), while autoantibody II-1 had an inhibitory effect of approximately 70% (►Fig. 2F).<sup>6</sup>

To conclude, we expanded the panel of cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies<sup>4-10</sup> by generating two novel anti-cysteine-spacer antibodies that are non-inhibitory and an anti-T2-T3 antibody that is also non-inhibitory in the fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay.

### Anti-ADAMTS13 Autoantibodies Recognize Cryptic Epitopes in ADAMTS13

The spacer domain of ADAMTS13 is known to be partly shielded by the CUB domains through direct interaction of the spacer and the CUB domains.<sup>19-21</sup> Abolishment of this interaction exposes cryptic epitopes in the so-called 'open'

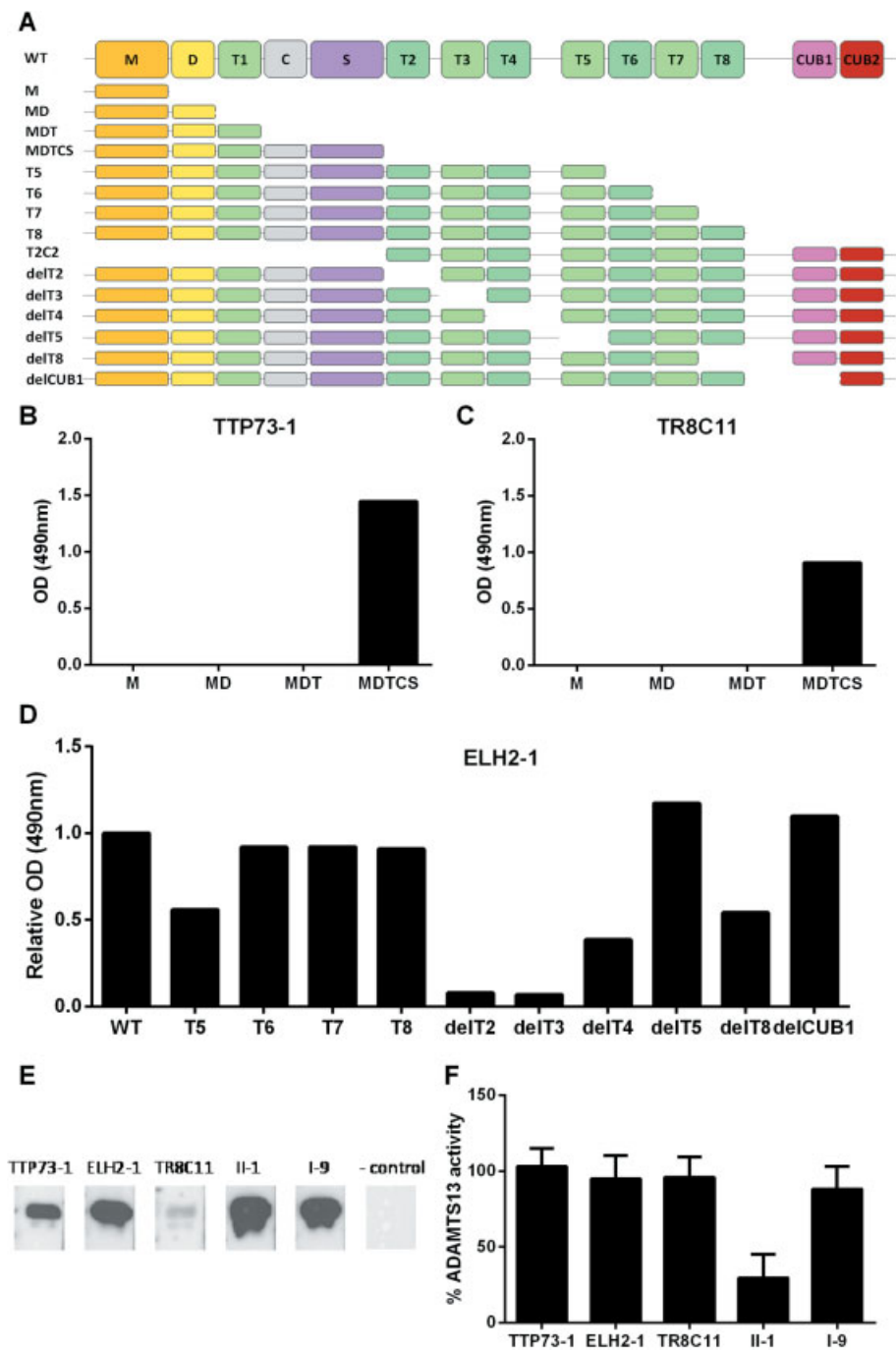
conformation of ADAMTS13, which we recently showed to be specifically present during the acute phase of iTTP patients.<sup>22</sup> Hence, we next wanted to analyse whether our three newly cloned autoantibodies could potentially recognize cryptic epitopes of ADAMTS13. To investigate if autoantibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 recognize cryptic epitopes, the capacity of the autoantibodies to capture ADAMTS13 or to bind to coated ADAMTS13 was compared in ELISA (►Fig. 3A). Antibodies that recognize cryptic epitopes will not be able to capture 'closed' ADAMTS13 from solution (►Fig. 3A, left), while those antibodies will bind to coated ADAMTS13 (►Fig. 3A, right), because coating of ADAMTS13 changes its conformation.<sup>22,41</sup> Interestingly, none of the newly cloned antibodies (TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11) were able to capture ADAMTS13 (►Fig. 3B), while they did bind to coated ADAMTS13 (►Fig. 3C), indicating that they indeed recognize cryptic epitopes in ADAMTS13. In contrast, the control autoantibody II-1 did both capture ADAMTS13 and bind to coated ADAMTS13 (►Figs. 3B and C). Intriguingly, control autoantibody I-9 could also not capture ADAMTS13 (►Fig. 3B) but could bind to coated ADAMTS13 (►Fig. 3C), showing for the first time, that the known antibody I-9 also recognizes a cryptic epitope in the spacer domain.

In conclusion, we specifically checked for the first time if cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies can recognize cryptic epitopes in ADAMTS13 and showed that iTTP patients can indeed have autoantibodies recognizing cryptic epitopes in the cysteine-spacer and T2-T3 domains.

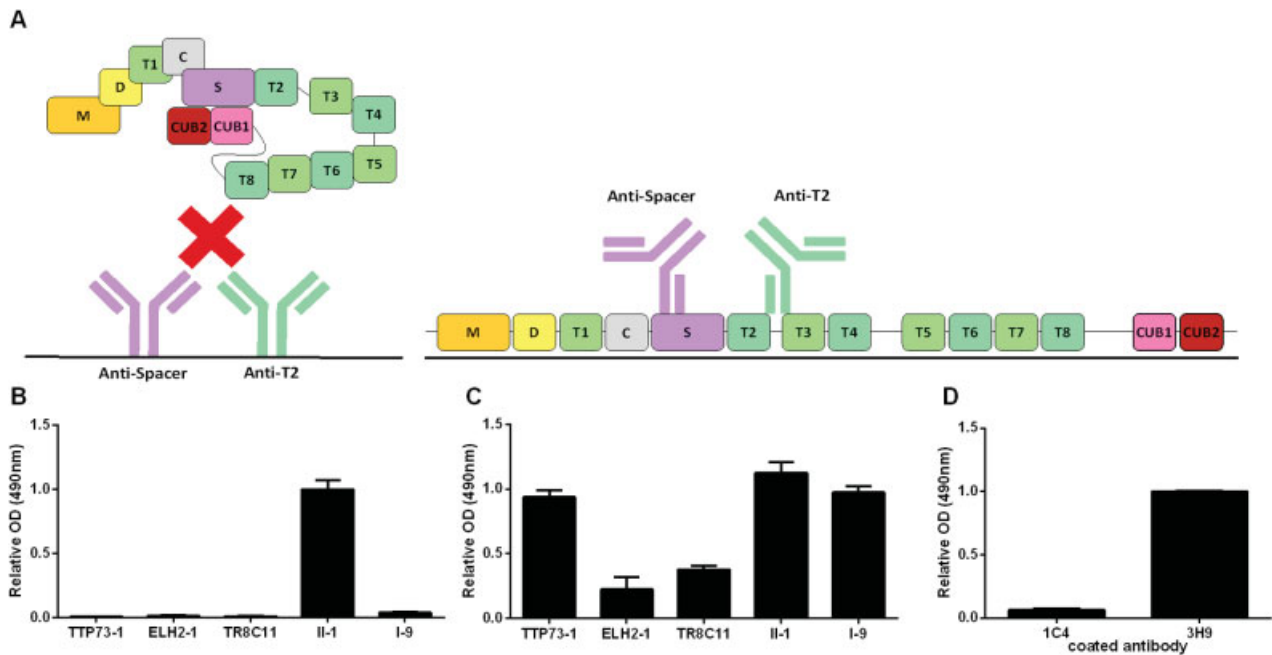
### Murine Anti-ADAMTS13 Antibody 3H9 Induces a Conformational Change in ADAMTS13

Initially, we did not expect to identify anti-ADAMTS13 autoantibodies recognizing cryptic epitopes as the anti-ADAMTS13 autoantibodies were selected on ADAMTS13 captured by our murine anti-human ADAMTS13 antibody 3H9. Capturing ADAMTS13 from solution was anticipated to exhibit ADAMTS13 in a folded conformation. However, since the autoantibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 recognize cryptic epitopes in ADAMTS13, this implies that capturing ADAMTS13 by 3H9 induces a conformational change in ADAMTS13 thereby exposing cryptic epitopes. To prove this, we used our murine anti-ADAMTS13 antibody 1C4, which was previously found to recognize a cryptic epitope in the spacer domain of ADAMTS13.<sup>22</sup> Indeed, ADAMTS13 in solution could not be captured by antibody 1C4 (►Fig. 3D). However, when ADAMTS13 was captured by antibody 3H9, antibody 1C4 did bind to ADAMTS13 (►Fig. 3D), proving that capturing ADAMTS13 on 3H9 indeed induces a conformational change in which cryptic epitopes become exposed. Hence, our anti-ADAMTS13 autoantibodies were selected on open ADAMTS13. Our results also suggest that labelling of the ADAMTS13 used for B cell sorting must have altered the conformation of ADAMTS13.

To conclude, selecting human anti-human ADAMTS13 antibodies that recognize cryptic epitopes in ADAMTS13 can be explained through the capturing of ADAMTS13 by murine anti-ADAMTS13 antibody 3H9 that apparently induces an open conformation in ADAMTS13.



**Fig. 2** The cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies TTP73-1 and TR8C11 recognize the ADAMTS13 cysteine–spacer domains while ELH2-1 is directed against the T2–T3 domains and none of the autoantibodies inhibit ADAMTS13 activity. (A) Structure of wild-type (WT) ADAMTS13 and its truncation (M, MD, MDT, MDTCS, T5, T6, T7, T8 and T2C2) and deletion variants (delT2, delT3, delT4, delT5, delT8 and delCUB1) that were used for the epitope mapping of the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies TTP73-1, TR8C11 and ELH2-1. The different domains in ADAMTS13 are: a metalloprotease domain (M), a disintegrin-like domain (D), a thrombospondin type 1 repeat (T1), a cysteine-rich domain (C), a spacer domain (S), another 7 T domains and 2 CUB domains. In the ADAMTS13 variants one or more domains have been deleted. (B–D) Epitope mapping of anti-ADAMTS13 autoantibodies TTP73-1 (B), TR8C11 (C) and ELH2-1 (D). The ADAMTS13 variants were captured by antibody 3H9 (5 µg/mL) on 96-well microtiter plates and the cloned human anti-ADAMTS13 autoantibodies were added. Bound antibodies were detected using horseradish peroxidase (HRP)-labelled rabbit anti-human immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies. For antibody ELH2-1 (D), relative optical density (OD) values were calculated by putting the OD value of the binding of ELH2-1 to WT ADAMTS13 as 1. (E) Western blot was performed to test whether the anti-ADAMTS13 autoantibodies recognize denatured ADAMTS13. A 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel was run with 50 nM of rhADAMTS13 under non-reducing conditions and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. After blocking, the cloned antibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 were added (1.5 µg/mL) and bound antibodies were detected using HRP-labelled rabbit anti-human IgG and IgM antibodies. The autoantibodies II-1 and I-9 were used as a positive control. Detection with only secondary antibody (– ‘control’) was used as negative control. (F) The inhibitory capacity of the cloned anti-ADAMTS13 autoantibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 was tested in the FRETs-VWF73 assay. Antibodies II-1 and I-9 were included as controls. The autoantibodies (10 µg/mL) were incubated with 0.03 µg/mL of plasma ADAMTS13. Activity of ADAMTS13 in normal human plasma pool (NHP) was set as 100%.



**Fig. 3** Anti-ADAMTS13 autoantibodies recognize cryptic epitopes in ADAMTS13. (A) Antibodies that recognize cryptic epitopes in ADAMTS13 cannot capture 'closed' ADAMTS13 from solution (left). Coating of ADAMTS13 induces conformational changes where cryptic epitopes become exposed. Antibodies recognizing those cryptic epitopes will now be able to bind (right). (B) A 96-well microtiter plate was coated with autoantibodies (TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11) and control antibodies II-1 and I-9 (5 µg/mL). Next, human plasma was added and bound ADAMTS13 was detected with biotinylated 3H9 and streptavidin-horseradish peroxidase (HRP). The optical density (OD) value corresponding to ADAMTS13 captured by II-1 was set as 1 and used to calculate the relative OD values. (C) A 96-well microtiter plate was coated with rhADAMTS13 (15 nM). Autoantibodies TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11 or controls II-1 and I-9 were added (6.25 µg/mL) and bound antibodies were detected with HRP-labelled rabbit anti-human immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies. Relative OD values were calculated by putting the OD value represented by binding of II-1 to coated rhADAMTS13 at 1. (D) A 96-well microtiter plate was coated with antibody 1C4 or 3H9 (5 µg/mL). Plasma ADAMTS13 was added and bound ADAMTS13 was detected, using biotinylated 3H9 or 1C4, respectively, followed by addition of streptavidin-HRP. The OD value corresponding to the binding of 1C4 to ADAMTS13 captured by 3H9 was set at 1 and used to calculate relative OD values. The murine anti-ADAMTS13 antibody 1C4 recognizes a cryptic epitope in plasma ADAMTS13. This epitope becomes exposed when ADAMTS13 is captured by 3H9.

## Discussion

We recently showed that ADAMTS13 in acute iTTP adopts an open conformation resulting in exposure of a cryptic epitope in the spacer domain.<sup>22</sup> In this study, we now cloned three anti-ADAMTS13 autoantibodies, TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11, from PBMCs of iTTP patients through B cell sorting and showed that all three antibodies recognize cryptic epitopes, either in the cysteine-spacer domains (TTP73-1 and TR8C11) or in the T2-T3 domains (ELH2-1).

We isolated 96 B cell clones from PBMCs of 13 iTTP patients of which 27 produced anti-ADAMTS13 IgG antibodies and 69 IgM antibodies (32 produced anti-ADAMTS13 IgM antibodies and 37 produced IgM antibodies that class switched to IgG antibodies during the incubation period). Hence, 72% of the viable anti-ADAMTS13 B-cells were of the IgM isotype, although IgM's are only found in approximately 10% of iTTP patients.<sup>39,40</sup> Sequence determination of 30 IgM antibodies revealed that they were generated from 16 different IGHV germline sequences and that 57% of the complete antibody sequences contained no SHM (derived from naïve IgM clones), while 43% did show SHM (generated after antigen encounter). Our data are in line with those described in our previous study, where anti-RhD antibodies were isolated from donors hyper-

immunized with D<sup>+</sup> erythrocytes using the same B cell sorting technology. Despite the almost complete absence of IgM anti-RhD antibodies in these donors, a high frequency (77%) of IgM expressing anti-RhD-specific B cells was found.<sup>23,31</sup> These IgM-producing clones were either naïve (no SHM) or were hypermutated by antigen encounter.<sup>23</sup> These results supported data generated in mice suggesting that a large pool of long-lasting IgM memory cells circulate in the peripheral blood and that these cells continuously replenish the IgG memory pool after repeated re-encounter of the antigen.<sup>31,42</sup> As the role of IgM presenting B cells and therefore also IgM antibodies could be larger than initially thought, also cloning of IgM antibodies could be useful in the future to better understand their role in iTTP and in (auto)immunity.

The remaining 27 anti-ADAMTS13 positive B cells produced IgG antibodies. The complete sequence of 5 of these IgG antibodies could be determined and revealed that they were generated from 5 different germ lines. The antibody sequences of anti-cysteine-spacer autoantibodies TR8C11 and TTP73-1 were derived from the germline sequence VH1-69 and VH4-39, respectively. Although the VH1-69 germline sequence was shown to be dominant in anti-spacer autoantibodies,<sup>6</sup> our and other studies show that anti-spacer antibody germline sequences are not restricted to the VH1-69 sequences.<sup>4,5,7,9,14</sup>

The SHM rate in the ADAMTS13-specific antibodies TR8C11, TTP73-1 and ELH2-1 was low or absent suggesting that additional antigen encounter might increase affinity for ADAMTS13. Indeed, it has been shown that affinity maturation of antibodies does occur during the disease course.<sup>43</sup> Selecting two antibodies (BM4H3 and ELH5B9) that were in the end not specific for ADAMTS13 or could not be expressed is also in line with our previous study<sup>23</sup> and stresses the importance of cloning and expressing antibodies selected from B cells before labelling them as antigen specific.

We previously showed that ADAMTS13 has an altered (or open) conformation, where a cryptic epitope in the spacer domain becomes exposed when patients are suffering from acute iTTP.<sup>22</sup> In this study, we isolated two anti-ADAMTS13 autoantibodies that recognize cryptic epitopes in the cysteine-spacer domains and one antibody that recognizes a cryptic epitope in the T2-T3 domains. Interestingly, Underwood et al recently presented a study at the International Society on Thrombosis and Haemostasis in Berlin where patient samples were screened for anti-ADAMTS13 autoantibodies against open and closed ADAMTS13. They showed that more autoantibodies could bind to open ADAMTS13 compared with closed ADAMTS13.<sup>44</sup> These data are in line with our study and show that iTTP patients indeed have anti-ADAMTS13 autoantibodies recognizing cryptic epitopes. How the open ADAMTS13 conformation and the circulating autoantibodies against cryptic epitopes contribute to ADAMTS13 deficiency remains to be determined. It is tempting to speculate that both the open ADAMTS13 conformation as well as the antibodies against cryptic epitopes contribute to ADAMTS13 clearance, an important determinant in the pathophysiology of iTTP<sup>18,45</sup> by a multi-step process. During acute iTTP, a—so far unknown—trigger opens ADAMTS13, cryptic epitopes become exposed and could induce autoantibody development recognizing these cryptic epitopes which will subsequently bind. Binding of these autoantibodies together with the (already) bound autoantibodies recognizing non-cryptic epitopes might lead to large immune complexes resulting in ADAMTS13 clearance. This might explain why some iTTP patients in remission still have anti-ADAMTS13 autoantibodies but no ADAMTS13 clearance. Hence, specifically targeting autoantibodies recognizing cryptic epitopes might be an effective immune therapy. Alternatively, targeting the factors that open ADAMTS13 might be another valuable strategy.

In this study, we also used the previously cloned anti-ADAMTS13 spacer domain autoantibodies I-9 and II-1 as control antibodies. We now demonstrated that also I-9 recognizes a cryptic epitope in the spacer domain as I-9 could not capture ADAMTS13 from solution but did bind to coated ADAMTS13 in ELISA. These data are in line with our previous findings that I-9 recognizes the same epitope as the murine monoclonal antibody 1C4, which we previously identified to recognize a cryptic epitope in the spacer domain of ADAMTS13.<sup>14,22</sup> Although antibody II-1 has an overlapping epitope with I-9 and 1C4, II-1 can capture 'closed' ADAMTS13 from solution in our ELISA. This is in line with the data of South et al<sup>20</sup> who could immunoprecipitate ADAMTS13 from solution by antibody II-1. However, inducing an open ADAMTS13 conformation increased the binding of II-1,<sup>20</sup> showing that epitope of II-1 is partially cryptic.

In conclusion, we were able to clone three novel specific anti-ADAMTS13 autoantibodies (TTP73-1, ELH2-1 and TR8C11) by sorting B cells from iTTP patients. In vitro characterization revealed that these anti-ADAMTS13 autoantibodies target cryptic epitopes in ADAMTS13. Whether these autoantibodies develop after exposure of the cryptic epitopes and if and how they contribute to antigen clearance, remain to be determined.

### What is known about this topic?

- Immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura (iTTP) patients are characterized by an absent ADAMTS13 activity, presence of polyclonal anti-ADAMTS13 autoantibodies and an open ADAMTS13 conformation with a cryptic epitope in the spacer domain exposed during an acute episode.
- Cloning of anti-ADAMTS13 autoantibodies helps to gain insight into how the anti-ADAMTS13 autoantibodies induce ADAMTS13 deficiency.

### What does this paper add?

- Anti-ADAMTS13 autoantibodies can be isolated and cloned through B cell sorting.
- iTTP patients have anti-ADAMTS13 autoantibodies that recognize cryptic epitopes in the spacer and T2T3 domains of ADAMTS13.
- Capturing ADAMTS13 by antibodies can induce conformational changes in ADAMTS13.

### Authors' Contributions

E.R., G.V., O.J.H.M.V., F.P. and K.V. designed the experiments. E.R., K.K., O.J.H.M.V., L.D., I.P., N.V. and A.V. performed the experiments. I.M., C.V., M.A.A., L.G., M.S., D.D. and F.P. provided clinical information and PBMCs from iTTP patients. A.S.S. developed the antibody 1C4 and J.V. provided the antibodies II-1 and I-9. E.R., G.V., K.K., O.J.H.M.V., I.M., H.D. and S.F.D.M. and K.V. interpreted the data. E.R. and K.V. wrote the manuscript, which was critically reviewed by G.V., K.K., O.J.H.M.V., I.M., A.S.S., J.V., M.A.A., L.G., M.S., D.D., H.D., S.F.D.M. and F.P. All authors approved the final version of the manuscript. K.V. provided funding.

### Funding

This work was supported by the European Framework Program for Research and Innovation (Horizon 2020 Marie Skłodowska Curie Innovative training network PROFILE grant 675746) and KU Leuven grants OT/14/071 and PF/10/014 awarded to K.V. A.S.S. is supported by a PhD grant from the Agency Innovation And Entrepreneurship (VLAIO, [www.iwt.be](http://www.iwt.be)), Flanders, Belgium (141136). Academische Stichting Leuven is acknowledged for providing a travel grant to E.R. to present this study at the ISTH 2017, Berlin, Germany.

**Conflict of Interest**

F.P. is a member of the scientific advisory boards of Ablynx and Shire.

**Acknowledgements**

The SV40 Large T coding region DNA sample is a gift from Genmab B.V. and has been generated based on the information provided in the publication entitled 'A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies'<sup>36</sup> in which the material was first described. The authors would like to thank Remco Visser, Magdalena A. Berkowska and Janne Caron for their technical assistance. The authors also acknowledge Erik de Graaf and Simon Tol for their assistance during the B cell sorting. M, MD, MDT and MDTCS mutants were a kind gift of Dr. Kenji Soejima (The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kikuchi, Kumamoto, Japan).

**References**

- Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001;276(44):41059–41063
- Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996;87(10):4235–4244
- Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996;87(10):4223–4234
- Ostertag EM, Kacir S, Thiboutot M, et al. ADAMTS13 autoantibodies cloned from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: 1. Structural and functional characterization in vitro. *Transfusion* 2016;56(07):1763–1774
- Schaller M, Vogel M, Kentouche K, Lämmle B, Kremer Hovinga JA. The splenic autoimmune response to ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura contains recurrent antigen-binding CDR3 motifs. *Blood* 2014;124(23):3469–3479
- Pos W, Luken BM, Kremer Hovinga JA, et al. VH1-69 germline encoded antibodies directed towards ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2009;7(03):421–428
- Luken BM, Kaijen PHP, Turenhout EAM, et al. Multiple B-cell clones producing antibodies directed to the spacer and disintegrin/thrombospondin type-1 repeat 1 (TSP1) of ADAMTS13 in a patient with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2006;4(11):2355–2364
- Foreman AL, Van de Water J, Gougeon ML, Gershwin ME. B cells in autoimmune diseases: insights from analyses of immunoglobulin variable (Ig V) gene usage. *Autoimmun Rev* 2007;6(06):387–401
- Siegel DL. Translational applications of antibody phage display. *Immunol Res* 2008;42(1-3):118–131
- Schaller M, Studt JD, Voorberg J, Kremer Hovinga JA. Acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Development of an autoimmune response. *Hamostaseologie* 2013;33(02):121–130
- Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004;103(12):4514–4519
- Zheng XL, Wu HM, Shang D, et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2010;95(09):1555–1562
- Luken BM, Turenhout EA, Hulstein JJJ, Van Mourik JA, Fijnheer R, Voorberg J. The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 2005;93(02):267–274
- Pos W, Sorvillo N, Fijnheer R, et al. Residues Arg568 and Phe592 contribute to an antigenic surface for anti-ADAMTS13 antibodies in the spacer domain. *Haematologica* 2011;96(11):1670–1677
- Luken BM, Turenhout EA, Kaijen PHP, et al. Amino acid regions 572–579 and 657–666 of the spacer domain of ADAMTS13 provide a common antigenic core required for binding of antibodies in patients with acquired TTP. *Thromb Haemost* 2006;96(03):295–301
- Pos W, Crawley JTB, Fijnheer R, Voorberg J, Lane DA, Luken BM. An autoantibody epitope comprising residues R660, Y661, and Y665 in the ADAMTS13 spacer domain identifies a binding site for the A2 domain of VWF. *Blood* 2010;115(08):1640–1649
- Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, et al. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood* 2003;102(09):3232–3237
- Thomas MR, de Groot R, Scully MA, Crawley JTB. Pathogenicity of anti-ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *EBioMedicine* 2015;2(08):942–952
- Muia J, Zhu J, Gupta G, et al. Allosteric activation of ADAMTS13 by von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(52):18584–18589
- South K, Luken BM, Crawley JTB, et al. Conformational activation of ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(52):18578–18583
- Deforche L, Roose E, Vandenbulcke A, et al. Linker regions and flexibility around the metalloprotease domain account for conformational activation of ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2015;13(11):2063–2075
- Roose E, Schelpe A-S, Joly BS, et al. An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2018;16(02):378–388
- Dohmen SE, Mulder A, Verhagen OJHM, Eijssink C, Franke-van Dijk MEI, van der Schoot CE. Production of recombinant Ig molecules from antigen-selected single B cells and restricted usage of Ig-gene segments by anti-D antibodies. *J Immunol Methods* 2005;298(1-2):9–20
- Feys HB, Roodt J, Vandeputte N, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (*Papio ursinus*). *Blood* 2010;116(12):2005–2010
- Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, Mannucci PM. ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol* 2007;138(04):534–540
- Feys HB, Vandeputte N, Palla R, et al. Inactivation of ADAMTS13 by plasmin as a potential cause of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2010;8(09):2053–2062
- Feys HB, Anderson PJ, Vanhoorelbeke K, Majerus EM, Sadler JE. Multi-step binding of ADAMTS-13 to von Willebrand factor. *J Thromb Haemost* 2009;7(12):2088–2095
- Lotta LA, Valsecchi C, Pontiggia S, et al. Measurement and prevalence of circulating ADAMTS13-specific immune complexes in autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2014;12(03):329–336
- Mancini I, Ferrari B, Valsecchi C, et al; Italian Group of TTP Investigators. ADAMTS13-specific circulating immune complexes as potential predictors of relapse in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Intern Med* 2017;39:79–83
- Mulder A, Kardol MJ, Kamp J, et al. Determination of the frequency of HLA antibody secreting B-lymphocytes in alloantigen sensitized individuals. *Clin Exp Immunol* 2001;124(01):9–15
- Della Valle L, Dohmen SE, Verhagen OJHM, Berkowska MA, Vidarsson G, Ellen van der Schoot C. The majority of human memory B cells recognizing RhD and tetanus resides in IgM+ B cells. *J Immunol* 2014;193(03):1071–1079
- Fath S, Bauer AP, Liss M, et al. Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance

- autologous mammalian gene expression. *PLoS One* 2011;6(03):e17596
- 33 Raab D, Graf M, Notka F, Schödl T, Wagner R. The GeneOptimizer Algorithm: using a sliding window approach to cope with the vast sequence space in multiparameter DNA sequence optimization. *Syst Synth Biol* 2010;4(03):215–225
  - 34 Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* 2004;22(07):346–353
  - 35 Plotkin JB, Robins H, Levine AJ. Tissue-specific codon usage and the expression of human genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(34):12588–12591
  - 36 Vink T, Oudshoorn-Dickmann M, Roza M, Reitsma JJ, de Jong RN. A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. *Methods* 2014;65(01):5–10
  - 37 Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005;129(01):93–100
  - 38 Rojas OL, Narváez CF, Greenberg HB, Angel J, Franco MA. Characterization of rotavirus specific B cells and their relation with serological memory. *Virology* 2008;380(02):234–242
  - 39 Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, et al; French Clinical and Biological Network on Adult Thrombotic Microangiopathies. Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity. *Blood* 2007;109(07):2815–2822
  - 40 Rieger M, Mannucci PM, Kremer Hovinga JA, et al. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. *Blood* 2005;106(04):1262–1267
  - 41 Majerus EM, Anderson PJ, Sadler JE. Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J Biol Chem* 2005;280(23):21773–21778
  - 42 Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 2009;10(12):1292–1299
  - 43 Froehlich-Zahnd R, George JN, Vesely SK, et al. Evidence for a role of anti-ADAMTS13 autoantibodies despite normal ADAMTS13 activity in recurrent thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2012;97(02):297–303
  - 44 Underwood MI, Thomas MR, Scully MA, Crawley JTB. Autoantibodies binding to “open” and “closed” ADAMTS13 in patients with acquired immune thrombotic thrombocytopenic purpura. *RPTH* 2017;1(01):255
  - 45 Alwan F, Vendramin C, Vanhoorelbeke K, et al. Presenting ADAMTS13 antibody and antigen levels predict prognosis in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2017;130(04):466–471

## REMERCIEMENTS

**A Seb**, pour ton accueil, ton soutien, ton encadrement, ta disponibilité, ta bonne humeur constante (avec moi !) alors que je suis médecin et que j'étais venu te voir sans argent, sans véritable idée de projet, sans connaissance approfondie du sujet et mal recommandé ! Merci du fond du cœur pour ta patience et ta compréhension. J'espère que de cette histoire, nous allons pouvoir en écrire d'autres, c'est aussi une belle amitié que je retiens.

**A Sandrine**, pour ton accompagnement constant, ton enseignement technique, je suis fier de t'avoir eue comme prof, c'est un vrai plaisir de travailler à tes côtés, et ta réputation de fée du laboratoire n'est pas usurpée !

**A Srini**, pour ton accueil, ta bienveillance envers moi, les discussions lors du tea-time, du lab-meeting et après, ta confiance pour l'article IgIV et sa (ré)-écriture. Ces 3 années resteront pour moi mes meilleurs souvenirs sur le plan professionnel et aussi très enrichissantes sur le plan culturel. Tu pourras compter sur moi pour le retour d'ascenseur !

**A Paul**, pour ton accompagnement, ta confiance, tes encouragements, ton soutien logistique et financier. C'est avec beaucoup de regrets que je n'ai pas pu te suivre à St Antoine et je suis ravi de voir que tu rejoignes le labo.

**A Simon**, pour cette première et dernière année de thèse, pour ton soutien et les discussions que nous avons eues tant sur les aspects organisationnels que scientifiques, ton approche du métier est un exemple à suivre.

**A Bernard Maillère**, pour son aide précieuse, son accueil et encadrement lors des passages à Saclay. Je retiens aussi les discussions autour des méthodes et des résultats observés, ces conseils m'ont vraiment permis de construire cette thèse.

**A mes rapporteurs**, pour leur rapport favorable, leurs discussions et commentaires bienveillants et surtout le délai record de rendu de leur rapport et les efforts pour maintenir ma soutenance à cette date malgré les grèves.

**A Roberto Mallone**, pour ses articles et méthodes qui sont toujours tombés à point nommé. Je garde également un excellent souvenir de mon petit passage au labo avec Marie Claude Gagnerault pour apprendre les secrets du test ELLISPOT.

**A Ivan**, pour tous ces partages techniques de manip et de mise au point, les discussions au labo ou lors des sorties after-work. Tout ça me manque !

**A Cyril**, pour tes conseils lors de mes débuts, les encouragements et surtout les bonnes rigolades et discussions (le casting du P..SG) autour du labo et de la bouffe. Dommage qu'on ne se voit plus comme avant !

**A Maud**, pour ton accueil dans le labo, toi, la chef des doctorants, tes conseils, ton soutien et l'exemple de ta rigueur dans la conduite des manips, tout ça dans la bonne humeur et avec féminité.

**A Bagi**, pour tes explications dont je ne comprenais rien mais qu'au final j'avais quand même une solution, pour ta bonne humeur et ta disponibilité. J'espère que tu trouveras ton bonheur dans ce monde compliqué et qu'on se reverra de temps à temps.

**A Nimesh**, pour tes conseils, les discussions et les sorties familiales ou sportives.

**A Chaitrali**, pour ta bonne humeur et ton sens critique, encore toutes mes félicitations pour avoir soutenu avant moi.

**A Agnès Veyradier et son équipe**, en particulier **Sandrine Thouzeau** et **Sylvaine Savigny** pour la découverte du test FRETs et l'obtention des échantillons de patients.

**A D Valmori et M Ayoub** pour vos conseils avisés, même si j'aurai voulu en profiter davantage

**A Sandrine Malot**, pour les échantillons de patients et discussions au sein du CNR MAT.

**A Cécile Denis**, pour la souris KO ADAMTS13 et l'ADAMTS13 recombinante, je m'en suis au final peu servi, c'était un bon départ !

**A Yu-Chun Lone**, pour les souris Sure L1/KO A13, même si je n'ai toujours pas compris par où elles sont passées et que les résultats obtenus soient similaires aux SureL1 seules...

**A Pascale Loiseau**, pour ses conseils concernant les molécules HLA, les tests et l'ADN des patients PTT.

A tous mes collègues, doctorants, post-docs ou chercheurs confirmés de l'équipe 16 : **Meenu, Ankit, Pushpa, Jordan, Mathieu, Jag, Anaëlle**,

A mes étudiants et presque étudiants de M2 : **Baptiste, Léa et Julien** : que de freins et obstacles pour tenter de vous faire venir et/ou obtenir des résultats, **Yousra**, pour ta détermination et l'intérêt que tu as porté lors de ton stage de M1, **Barricki**, pour ta bonne humeur et les efforts fournis pour ton BTS !

Aux secrétaires **Marie Françoise**, qui m'a accueilli mieux qu'une mère et à **Véronique**, pour ta bonne humeur et organisation. Une spéciale dédicace pour Justa !

Aux copains doctorants du CRC : **Vincent** (pour nos repas mensuels si stimulants), **Basile, Laurianne, Malika, Katia, Laura, Antoine, Adrien, Jeremy, Romain, Claire, Thomas, Caroline, Sophie**: les 13<sup>e</sup> JED resteront les meilleures !

**A Quentin et Sophie de l'équipe 13**, pour les Ellispot et échanges d'expériences immuno

A mes copains doctorants hors CRC : **Tereza, Matthieu** (avec la précieuse aide de Lucie), pour votre aide (l'irradiateur de Necker !!), encouragements et discussions si enrichissantes.

**Mille mercis aux médecins participant au CNR MAT**, qui m'ont permis d'obtenir tant d'échantillons en si peu de temps.

Un grand merci **aux patients** pour avoir accepté de confier leurs échantillons de sang.

**A Baxter**, pour votre ADAMTS13 recombinante de compétition, qu'on attend toujours avec impatience pour les patients

**Aux membres de mon(mes) Jury** pour votre participation réelle et/ou avortée, vos précieux commentaires.

**A mes parents et enfants** pour votre soutien malgré mes absences loin de vous.

**A l'INSERM**, pour l'obtention de mon poste accueil, qui m'a permis de vivre décemment pendant les 2 dernières années de thèse

**A la SNFMI et à l'institut Curie (St Cloud)**, pour son soutien financier et les gardes qui m'ont sauvé et permis de débiter cette thèse puis de la continuer dans de bonnes conditions.

**A Roche**, pour son soutien financier, même minime, ça a permis de boucler l'histoire

**A Baptiste Hervier et ses enfants**, je me rappelle de cette astreinte du 15 août où j'ai fini mes dernières manip'

**Enfin, un immense merci à Claire, pour tout ! Tu es plus qu'une épouse, cette thèse, tu l'as faite avec moi !**

**Et 2 derniers :**

Sincère : A JCW et CAR qui ont refusé de me recevoir dans leur laboratoire, avec toutes les conséquences bénéfiques pour moi mais finalement, j'y ai quand même mis les pieds !

Ironique : A la direction de l'ED qui se reconnaîtra et qui a refusé mon inscription en 5<sup>e</sup> année alors qu'il ne me restait plus beaucoup de choses à faire/écrire... Au département VAE de l'UPMC qui voulait me racketter de 6000€ pour je ne sais pas quoi en fait...vu leur inutilité et au CdS de St A. qui m'a bien dit qu'il n'avait rien à cirer du PTT et de moi...

**Titre :** Identification des épitopes T d'ADAMTS13 chez les patients atteints de Purpura Thrombotique Thrombocytopénique

**Mots clés :** PTT, ADAMTS13, Epitope T, purpura, MAT

**Résumé :** Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une maladie auto-immune rare et grave caractérisée par la présence d'anticorps dirigés contre ADAMTS13 (A13), une protéase impliquée dans l'hémostase primaire. L'implication des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'ADAMTS13, dans la physiopathologie de la maladie est suggérée par une restriction pour l'haplotype HLA-DRB1\*11 (DR11), l'isotype IgG des anticorps.

Dans ce travail, nous avons cherché à identifier les épitopes T d'A13.

Tout d'abord, nous avons sélectionné *in silico* les peptides d'A13 susceptibles d'être présentés par les molécules HLA-DR11. Ensuite, l'étude de la liaison de ces peptides à des molécules HLA-DR11 par des tests ELISA compétitifs a permis d'identifier les peptides les plus affins.

Enfin, nous avons déterminé les peptides d'ADAMTS13 reconnus par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de donneurs sains et de patients porteurs de l'haplotype DR11. Ces travaux ont également été reproduits pour l'haplotype HLA-DR1 et dans un modèle murin de souris transgéniques humanisées exprimant l'haplotype HLA-DR1.

Les résultats de ce travail nous permettent d'envisager d'isoler des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'ADAMTS13 chez les patients afin de mieux les caractériser aux différents stades de la maladie et de suivre leur évolution sous traitement dans le but de mieux anticiper les rechutes.

**Title :** ADAMTS13 T cell epitope identification in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura patients

**Keywords :** TTP, ADAMTS13, T-Cell epitope, purpura, TMA

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a rare and severe disease characterized by auto-antibodies directed against ADAMTS13 (A13), a plasmatic protein involved in haemostasis. The implication of CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of the disease is suggested by the existence of a restriction to particular HLA-DR alleles and by the IgG isotype of the antibodies.

In this study, we wished to determine the T cell epitopes of A13.

First, we selected *in silico* the immunodominant peptides, based on their binding capacity to HLA-DR11 molecules.

Second, their binding capacity to purified HLA-DR1 molecules using a ELISA competitive assay led us to identify the best binder peptides. Finally, we determined the peptides recognized by human CD4<sup>+</sup> T cells from DR11 healthy donors and patients. These results were reproduced for the HLA-DR1 haplotype and in a transgenic humanized HLA-DR1 mouse model.

In a perspective point of view, our results will allow us to further isolate the specific CD4<sup>+</sup> T cells in order to characterize them at different steps of the disease and during follow-up to better anticipate relapses.