



**HAL**  
open science

# Physiopathologie du purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical

Nicolas Béranger

► **To cite this version:**

Nicolas Béranger. Physiopathologie du purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical. Hématologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5131 . tel-04608232

**HAL Id: tel-04608232**

**<https://theses.hal.science/tel-04608232v1>**

Submitted on 11 Jun 2024

**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.

# Université Paris Cité

**Ecole doctorale 561 – Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies**

***URP-3518 Recherche clinique appliquée à l'hématologie***

## **Physiopathologie du purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical**

Par Nicolas BERANGER

Thèse de doctorat d'Université en Hématologie

Dirigée par Madame le Professeur Agnès VEYRADIÈRE

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 6 décembre 2022

Devant un jury composé de :

Madame le Docteur Cécile DENIS, DR, Université Paris Saclay, Rapporteur

Monsieur le Professeur Pierre-Emmanuel MORANGE, PU-PH, Aix-Marseille Université, Rapporteur

Madame le Professeur Agnès VEYRADIÈRE, PU-PH, Hôpital Saint-Louis et Université Paris Cité, Directeur de thèse

Madame le Professeur Corinne COLLET, PU-PH, Université Paris Cité, Examineur

Monsieur le Professeur Paul COPPO, PU-PH, Sorbonne Université, Examineur

Monsieur le Professeur Eric RONDEAU, PU-PH, Sorbonne Université Examineur

Monsieur le Professeur Vassilis TSATSARIS, PU-PH, Université Paris Cité, Examineur

Madame le Docteur Bérangère JOLY, MCU-PH, Université Paris Cité, Co-encadrante et membre invitée

## **Titre : Physiopathologie du purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical**

**Résumé :** Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une forme de microangiopathie thrombotique (MAT) secondaire à un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13, la protéase spécifique de clivage du facteur Willebrand (VWF). A l'état basal, ADAMTS13 adopte une conformation fermée et son activation allostérique par le VWF induit une conformation ouverte. Le PTT obstétrical constitue une entité particulière, tant au sein du PTT (~10% des cas de PTT) qu'au sein de l'ensemble des MAT pouvant survenir en contexte obstétrical. L'objectif principal de notre travail a été de caractériser de manière exhaustive les 108 patientes du registre français de PTT obstétrical. La première partie de ce travail est consacrée à l'étude de la valeur diagnostique de nouvelles méthodes d'exploration du couple VWF/ADAMTS13. La distribution des multimères du VWF à la phase aiguë du PTT est très hétérogène, ce qui en limite la pertinence clinique. En revanche, une nouvelle méthode automatisée de mesure de l'activité d'ADAMTS13 est très prometteuse. La deuxième partie de ce travail est consacrée à l'étude épidémiologique et physiopathologique du PTT en contexte obstétrical. Trois entités de PTT obstétrical de mécanismes différents coexistent : le PTT acquis auto-immun (PTTi), le PTT congénital de révélation adulte (PTTc) et nous décrivons une forme inédite, le PTT de mécanisme indéterminé obstétrical (PTTu). La conformation d'ADAMTS13 est ouverte dans le PTTi et le PTTu mais fermée dans le PTTc. Le pronostic à court, moyen et long termes (en particulier le risque de rechute à l'occasion de grossesses ultérieures), dépend intimement du mécanisme du PTT. Dans la troisième et dernière partie de ce travail, nous avons posé les bases d'une recherche de facteurs de risque constitutionnels impliqués soit dans le développement du PTTi soit dans la modulation de l'expression clinique du PTTc. En analysant 20 ans d'expérience dédiés à la cohorte française de PTT obstétrical, ce travail apporte des réponses physiopathologiques, diagnostiques et thérapeutiques qui serviront de support à la rédaction de recommandations mieux codifiées.

**Mots clefs :** Purpura thrombotique thrombocytopénique, microangiopathie thrombotique, ADAMTS13, activité d'ADAMTS13, facteur Willebrand, grossesse, anticorps anti-ADAMTS13, mutations génétiques, conformation

## **Title : Pathophysiology of pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura**

**Abstract :** Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a thrombotic microangiopathy (TMA) caused by a severe functional deficiency of ADAMTS13, the specific VWF cleavage protease. In the basal state, ADAMTS13 circulates in a closed conformation, and its allosteric activation by VWF induces an open conformation. Pregnancy-onset TTP is a particular entity, both within TTP (~10% of TTP cases) and within all TMAs that may occur in the obstetrical context. The main objective of our work was to extensively characterize the 108 patients of the french pregnancy-onset TTP registry. The first part of this work was dedicated to the study of the diagnostic value of new methods of exploration of the VWF/ADAMTS13 axis. VWF multimers patterns at the acute phase of TTP were very heterogeneous, which limits the clinical relevance. On the other hand, a new automated method of assessment of ADAMTS13 activity proved very promising. The second part of this work focused on the epidemiological and pathophysiological study of pregnancy-onset TTP. Three distinct entities of pregnancy-onset TTP coexist: autoimmune acquired TTP (iTTP), adult-onset congenital TTP (cTTP) and we describe a new form of this disease, pregnancy-onset TTP of unidentified mechanism (uTTP). ADAMTS13 conformation is open in iTTP and uTTP but closed in cTTP. The short, medium, and long-term prognosis (especially the risk of relapse in subsequent pregnancies) is strongly dependent on the mechanism of TTP. In the third and last part of this work, we laid the foundations for research on constitutional risk factors involved either in the development of iTTP or in the variability of the clinical presentation of cTTP. By investigating 20 years of experience of the French pregnancy-onset TTP cohort, this work provides pathophysiological, diagnostic and therapeutic insights that will serve as a basis for better codified recommendations.

**Keywords :** Thrombotic thrombocytopenic purpura, thrombotic microangiopathy, ADAMTS13, ADAMTS13 activity, Von Willebrand factor, pregnancy, anti-ADAMTS13 antibodies, genetic sequence variations, conformation

Never confuse education with intelligence, you can have a PhD and still be an idiot.

**Professeur Richard Feynman – Prix Nobel de Physique 1965**



## **REMERCIEMENTS**

### **Professeur Agnès Veyradier**

Depuis ce cours de DES en 2015 où vous avez d'un coup éclairé la maladie de Willebrand qui était alors bien obscure dans mon esprit. J'ai eu la chance de réaliser un Master 2, une thèse d'exercice et une thèse de sciences sous votre direction et de bénéficier de vos qualités pédagogiques, dans un climat de liberté intellectuelle. Merci de votre soutien et de votre bienveillance dont je vous suis infiniment reconnaissant.

### **Docteur Bérangère Joly**

Depuis ce semestre d'internat en 2016 où j'ai eu la chance d'apprendre l'hémostase à tes côtés. Merci pour ton engagement dans tous les projets que j'ai menés, pour ta grande disponibilité et ta rigueur sans faille.

### **Professeur Paul Coppo**

Je vous remercie d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse de sciences, que j'espère à la hauteur de vos attentes. C'était un honneur pour moi de pouvoir collaborer avec vous au sein du CNR-MAT. Recevez ma profonde gratitude pour votre aide et votre soutien.

### **Docteur Cécile Denis**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail. Je vous remercie pour vos conseils et vos encouragements.

### **Professeur Pierre-Emmanuel Morange**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être le rapporteur de cette thèse et de l'intérêt que vous portez à ce travail.

### **Professeur Corinne Collet**

Je vous remercie de m'avoir initié aux mystères de la génétique moléculaire depuis mon semestre d'internat à vos côtés jusqu'à ce travail de thèse. Recevez toute ma gratitude pour vos remarquables qualités pédagogiques et vos encouragements.

### **Professeur Vassili Tsatsaris**

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse en tant que référent obstétricien. Soyez assuré de ma reconnaissance.

### **Professeur Eric Rondeau,**

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse en tant qu'expert des MAT. Soyez assuré de mon profond respect.

### **Professeur Hervé Dombret**

Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe de recherche, l'URP-3518, depuis mon Master 2 jusqu'à ma thèse de sciences. Merci pour votre soutien.

### **Docteur Pierre Boisseau**

Je vous remercie de votre collaboration considérable sur le volet génétique moléculaire de cette thèse, pour votre pédagogie et votre bienveillance. Soyez assuré de ma reconnaissance.

**Professor Karen Vanhoorelbeke**

Many thanks for your unvaluable collaboration. Please be assured of my deepest gratitude.

A tous les **cliniciens, biologistes, techniciens et ARC du CNR-MAT**, merci pour votre aide et votre collaboration dans nos projets de recherche clinique.

A la **filière MARIH**, merci pour votre soutien.

**Docteur Nathalie Itzhar-Baïkian**

Mille mercis pour ta bienveillance sans limite et ta pédagogie. Je mesure la chance que j'ai eu de travailler à tes côtés et je t'en suis très reconnaissant.

Professeur **Jean-Louis Laplanche**, **Docteur Gilles Morineau**, **Docteur Elisabeth Masson**

Merci pour votre collaboration et votre engagement dans ce travail de thèse.

Aux **techniciens de jour et de nuit et aux secrétaires du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Lariboisière**, merci pour votre bonne humeur, pour votre conscience professionnelle remarquable et pour votre soutien.

**Docteur Evelyne Heng**

Merci pour ton aide inestimable dans la réalisation des figures de cette thèse.

A l'indispensable équipe ADAMTS13 : **Sandrine Benghezal**, **Sophie Capdenat**, **Adeline Delton** et **Sylvaine Savigny**. Votre aide et votre soutien m'auront été très précieux, et je vous en remercie. Je vous souhaite le meilleur pour vos projets personnels et professionnels.

## TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>I. Le couple facteur Willebrand/ADAMTS13 _____</b>  | <b>10</b> |
| 1. Facteur Willebrand _____  | 10        |
| a) Biosynthèse _____   | 10        |
| b) Structure primaire _____  | 10        |
| c) Modifications post-traductionnelles _____   | 11        |
| d) Stockage et sécrétion _____   | 12        |
| e) Sensibilité aux forces de cisaillement et régulation par ADAMTS13 _____   | 13        |
| f) Fonctions du facteur Willebrand dans l'hémostase primaire et la coagulation _____   | 14        |
| g) Clairance _____   | 15        |
| 2. ADAMTS13 _____  | 15        |
| a) Biosynthèse, sécrétion et modulation _____  | 15        |
| b) Structure primaire _____  | 16        |
| c) Fonction _____  | 16        |
| d) Conformation d'ADAMTS13 _____   | 17        |
| <b>II. Le purpura thrombotique thrombocytopénique _____</b>  | <b>18</b> |
| 1. Historique _____  | 18        |
| 2. Epidémiologie _____   | 19        |
| 3. Physiopathologie _____  | 21        |
| a) Forme congénitale de purpura thrombotique thrombocytopénique _____  | 21        |
| b) Forme acquise de purpura thrombotique thrombocytopénique _____  | 22        |
| 4. Diagnostic biologique _____   | 25        |
| 5. Prise en charge thérapeutique _____   | 27        |
| a) Historique _____  | 27        |
| b) Cibles thérapeutiques en 2022 _____   | 28        |
| 6. Suivi _____   | 30        |
| <b>III. Le purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical _____</b>   | <b>31</b> |
| 1. Modifications de l'hémostase au cours de la grossesse _____   | 31        |
| 2. Rupture de tolérance immune en contexte obstétrical _____   | 33        |
| 3. Purpura thrombotique thrombocytopénique de révélation obstétricale _____  | 33        |
| a) Purpura thrombotique thrombocytopénique congénital de révélation obstétricale _____   | 34        |
| b) Purpura thrombotique thrombocytopénique acquis de révélation obstétricale _____   | 35        |
| 4. Diagnostic différentiel du purpura thrombotique thrombocytopénique avec les autres<br>microangiopathies thrombotiques de la grossesse _____ | 35        |
| a) Pré-éclampsie, éclampsie et HELLP syndrome _____  | 36        |

|  |           |
|--|-----------|
| b) Autres microangiopathies thrombotiques en contexte obstétrical _____                                  | 39        |
| 5. Spécificités de la prise en charge et du suivi _____  | 41        |
| a) Purpura thrombotique thrombocytopénique congénital révélé en contexte obstétrical _____               | 41        |
| b) Purpura thrombotique thrombocytopénique acquis de révélation obstétricale _____                       | 42        |
| 6. Recommandations internationales de prise en charge _____  | 43        |
| <b>OBJECTIFS.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>PATIENTS, MATERIEL ET METHODES.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>I. Patientes, recueil de données cliniques et prélèvements biologiques _____</b>                      | <b>47</b> |
| 1. Le CNR-MAT _____  | 47        |
| 2. Registre du CNR-MAT et critères d'inclusion _____   | 48        |
| 3. Prélèvements biologiques _____  | 48        |
| <b>II. Matériel et Méthodes _____</b>  | <b>48</b> |
| 1. Estimation du degré de multimérisation du facteur Willebrand _____                                    | 48        |
| a) Mesure antigénique du facteur Willebrand (VWF:Ag) _____   | 48        |
| b) Mesure de la capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF:CB) _____                    | 49        |
| c) Electrophorèse des multimères du facteur Willebrand _____   | 49        |
| 2. Exploration biologique d'ADAMTS13 _____   | 50        |
| a) Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par la méthode de référence FRETS-VWF73 _____                         | 50        |
| b) Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par une méthode immuno-enzymatique chromogénique ____                 | 51        |
| c) Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par une méthode immunologique en chimiluminescence automatisée _____  | 52        |
| d) Mesure semi-quantitative de l'activité d'ADAMTS13 par un test rapide d'orientation diagnostique _____ | 52        |
| e) Recherche et titrage des anticorps anti-ADAMTS13 _____  | 53        |
| 3. Etude de la conformation d'ADAMTS13 _____   | 53        |
| a) Mesure de l'antigène d'ADAMTS13 (3H9-ELISA) _____   | 54        |
| b) Etude de la conformation d'ADAMTS13 (1C4-ELISA) _____   | 54        |
| c) Calcul de l'index de conformation _____   | 56        |
| 4. Recherche de facteurs de risque génétiques dans le PTT _____  | 56        |
| a) Extraction d'ADN _____  | 56        |
| b) Séquençage de l'exon 24 du gène <i>ADAMTS13</i> _____   | 57        |
| c) Séquençage haut débit des gènes <i>VWF, F8, ADAMTS13, GP1BA, ITGA2B, ITGB3</i> _____                  | 59        |
| 5. Analyse statistique. _____  | 60        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>RESULTATS .....</b>  | <b>61</b>  |
| <b>I. Evaluation et développement de nouvelles méthodes d'exploration biologique du facteur Willebrand et d'ADAMTS13 .....</b>  | <b>61</b>  |
| 1. Etude de la répartition des multimères du facteur Willebrand et de la liaison du facteur Willebrand au collagène à la phase aiguë du purpura thrombotique thrombocytopénique acquis .....  | 61         |
| 2. Evaluation d'un test rapide d'orientation diagnostique et d'une méthode automatisée de mesure de l'activité d'ADAMTS13. ....   | 72         |
| <b>II. Purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical : étude du registre français du Centre National de Référence des Microangiopathies Thrombotiques (1999-2020) .....</b> | <b>100</b> |
| <b>III. Recherche de facteurs de risque constitutionnels impliqués dans le purpura thrombotique thrombocytopénique obstétrical .....</b>  | <b>132</b> |
| <b>DISCUSSION .....</b>   | <b>140</b> |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>   | <b>148</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>   | <b>151</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>  | <b>179</b> |

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Figure 1. Structure primaire en domaines d'un monomère de facteur Willebrand et sites de liaison avec ses principaux ligands (d'après Zhou et al., Blood, 2012).....</i>                         | <i>11</i> |
| <i>Figure 2. Processus de dimérisation puis de multimérisation du facteur Willebrand. ....</i>  | <i>12</i> |
| <i>Figure 3. Sensibilité du facteur Willebrand aux forces de cisaillement (d'après Siedlicki et al., Blood, 1996) .....</i>   | <i>13</i> |
| <i>Figure 4. Le facteur Willebrand dans l'hémostase primaire (d'après Leebeek et al., N. Engl. J. Med., 2016) . ....</i>  | <i>14</i> |
| <i>Figure 5. Relations exons-domaines de la protéine ADAMTS13 (d'après Zheng et al., J. Biol. Chem., 2001).....</i>   | <i>16</i> |
| <i>Figure 6. Clivage du facteur Willebrand par ADAMTS13 : la fermeture éclair moléculaire (d'après Petri et al., Nat. Comm., 2019).....</i>   | <i>17</i> |
| <i>Figure 7. Conformation d'ADAMTS13 : d'une conformation physiologique « fermée » à une conformation « ouverte » par activation allostérique (d'après Ercig et al., J. Biol. Chem., 2021).....</i> | <i>18</i> |
| <i>Figure 8. Epidémiologie du purpura thrombotique thrombocytopénique : représentation de 100 patients en fonction de l'âge au diagnostic et du mécanisme du déficit sévère en ADAMTS13. ....</i>   | <i>20</i> |
| <i>Figure 9. Gène ADAMTS13 et mutations responsables du purpura thrombotique thrombocytopénique congénital révélé à l'âge adulte. ....</i>  | <i>22</i> |
| <i>Figure 10. Rupture de tolérance immune et production d'auto-anticorps anti-ADAMTS13.23</i>   |           |
| <i>Figure 11. Caractéristiques biologiques du purpura thrombotique thrombocytopénique acquis auto-immun. ....</i>   | <i>24</i> |
| <i>Figure 12. Stratégie d'exploration biologique d'une suspicion clinique de purpura thrombotique thrombocytopénique .....</i>  | <i>26</i> |
| <i>Figure 13. Cibles thérapeutiques du purpura thrombotique thrombocytopénique en 2022</i>  | <i>30</i> |
| <i>Figure 14. Suivi des patients atteints de purpura thrombotique thrombocytopénique.....</i>   | <i>31</i> |

|   |    |
|---|----|
| <i>Figure 15. Evolution des taux de facteur Willebrand et d'ADAMTS13 au cours de la grossesse et en post-partum.</i> .....  | 32 |
| <i>Figure 16. Facteurs de risque et facteurs précipitants associés au purpura thrombotique thrombocytopénique de révélation obstétricale.</i> .....               | 33 |
| <i>Figure 17. Purpura thrombotique thrombocytopénique et autres microangiopathies thrombotiques de la grossesse : un diagnostic différentiel difficile.</i> ..... | 36 |
| <i>Figure 18. Critères diagnostiques de la pré-éclampsie.</i> .....   | 37 |
| <i>Figure 19. Déséquilibre entre sFlt-1 (facteur anti-angiogénique) et PlGF (facteur angiogénique) dans la physiopathologie de la pré-éclampsie.</i> .....        | 38 |
| <i>Figure 20. Stratégies d'utilisation du ratio sFlt-1/PlGF pour le dépistage et le diagnostic de prééclampsie.</i> .....   | 39 |
| <i>Figure 21. Maillage territorial du CNR-MAT.</i> .....  | 47 |
| <i>Figure 22. Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par la méthode de Kokame</i> .....  | 51 |
| <i>Figure 23. Exemple de test rapide d'orientation diagnostique Technoscreen® ADAMTS13 activity.</i> .....  | 53 |
| <i>Figure 24. Epitopes des anticorps anti-ADAMTS13 1C4 et 17G2.</i> .....   | 55 |
| <i>Figure 25. Détermination de la conformation d'ADAMTS13 par 1C4 ELISA</i> .....   | 56 |

## **TABLE DES TABLEAUX**

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Tableau 1. Comparaison du French Score et du PLASMIC Score. ....</i>  | <i>25</i> |
| <i>Tableau 2. Critères d'évaluation de la réponse au traitement à la phase aiguë et au cours du suivi du purpura thrombotique thrombocytopénique (d'après Cuker et al., Blood, 2021)..</i> | <i>28</i> |
| <i>Tableau 3. Spécificités cliniques et biologiques permettant de discriminer les microangiopathies thrombotiques obstétricales.....</i>   | <i>41</i> |
| <i>Tableau 4. Recommandations internationales pour le diagnostic et la prise en charge du purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical .....</i>                        | <i>44</i> |
| <i>Tableau 5. Protocole d'amplification de l'ADN de l'exon 24 du gène ADAMTS13 .....</i>   | <i>57</i> |
| <i>Tableau 6. Protocole de la réaction de séquence de l'exon 24 du gène ADAMTS13.....</i>  | <i>58</i> |
| <i>Tableau 7. Transcrits des gènes VWF, F8, ADAMTS13, GP1BA, ITGA2B et ITGB3.....</i>  | <i>59</i> |



## LISTE DES ABREVIATIONS

|             |  |
|-------------|--|
| aa          | Acides aminés  |
| ADAMTS13    | <i>A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13</i>                                     |
| ADAMTS13:Ag | Antigène d'ADAMTS13  |
| ADP         | Adénosine diphosphate  |
| ASPGR       | <i>Asialoglycoprotein receptors</i>  |
| CAPS        | Syndrome catastrophique des antiphospholipides, <i>catastrophic antiphospholipid syndrome</i>                    |
| CIC         | Complexe immunitaire circulant   |
| CIQ         | Contrôle interne de qualité  |
| CIVD        | Coagulation intravasculaire disséminée   |
| CLEC4M      | <i>C-type lectin domain family 4 member M</i>  |
| CMH         | Complexe majeur d'histocompatibilité   |
| CNR-MAT     | Centre National de Référence des MicroAngiopathies Thrombotiques (France)  |
| COVID19     | Maladie à coronavirus 2019   |
| CRMW        | Centre de Référence de la Maladie de Willebrand (France)   |
| CUB         | <i>Complement protein subcomponents C1r/C1s, Urchin embryonic growth factor and Bone morphogenetic protein 1</i> |
| Da          | Dalton   |
| DGOS        | Direction générale de l'offre de soins   |
| ELISA       | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>   |
| EP          | Echanges plasmatiques  |
| FRETS       | <i>Fluorescence-resonance energy transfer</i>  |
| FVIII       | Facteur VIII de la coagulation (facteur anti-hémophilique A)   |
| FVIII:C     | Activité coagulante du facteur VIII  |
| GPIba       | Glycoprotéine Iba plaquettaire   |
| GST         | <i>Glutathione-S-transferase</i>   |
| hADAMTS13   | ADAMTS13 humaine   |
| HELLP       | <i>Hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets</i>   |
| HGVS        | <i>Human Genome Variation Society</i>  |
| HRP         | <i>Horseradish peroxidase</i>  |
| IC          | Index de conformation  |
| IDT         | <i>integrated DNA technologies</i>   |
| Ig          | Immunoglobulines   |
| ISTH        | <i>International Society for Thrombosis and Haemostasis</i>  |
| Kb          | Kilobases  |
| LDH         | Lactate déshydrogénase   |

|            |  |
|------------|--|
| LRP1       | <i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>  |
| MAT        | Microangiopathie thrombotique  |
| MFIU       | Mort fœtale <i>in utero</i>  |
| MGL        | <i>Monoacylglycerol lipase</i>   |
| MIM        | <i>Mendelian inheritance in man</i>  |
| MSR1       | <i>Macrophage scavenger receptor 1</i>   |
| NAC        | N-acétylcystéine   |
| NPP        | <i>Normal pooled plasma</i>  |
| OPD        | Orthophénylène diamine   |
| PE         | Prééclampsie   |
| PFC        | Plasma frais congelé   |
| PHRC       | Programme hospitalier de recherche clinique  |
| PIGF       | <i>Placental growth factor</i>   |
| PNMR       | Plan National Maladies Rares   |
| PTT        | Purpura thrombotique thrombocytopénique  |
| PTTa       | Purpura thrombotique thrombocytopénique acquis   |
| PTTc       | Purpura thrombotique thrombocytopénique congénital   |
| PTTi       | Purpura thrombotique thrombocytopénique acquis auto-immun  |
| PTTu       | Purpura thrombotique thrombocytopénique de physiopathologie non identifiée ( <i>unidentified pathophysiology</i> ) |
| RCIU       | Retard de croissance intra-utérin  |
| RCP        | Réunion de concertation pluridisciplinaire   |
| rhADAMTS13 | ADAMTS13 humaine recombinante  |
| SA         | Semaine d'aménorrhée   |
| SAPL       | Syndrome des antiphospholipides  |
| sFit-1     | <i>Soluble fmd-like tyrosine kinase 1</i>  |
| SHAG       | Stéatose hépatique aiguë gravidique  |
| SHUa       | Syndrome hémolytique et urémique atypique  |
| SHU-STEC   | Syndrome hémolytique et urémique associé à <i>Escherichia coli</i> producteur de shigatoxines                      |
| SNARE      | <i>Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>                                       |
| Th         | Lymphocytes T auxiliaires  |
| Treg       | Lymphocytes T régulateurs  |
| TMB        | 3,3',5,5' – tetraméthylbenzidine   |
| TSP1       | Thrombospondine type 1   |
| USS        | Syndrome d'Upshaw-Schulman, <i>Upshaw-Schulman syndrome</i> (nomenclature internationale)                          |
| VEGF       | <i>Vascular endothelial growth factor</i>  |
| VHB        | Virus de l'hépatite B  |

|          |  |
|----------|--|
| VHC      | Virus de l'hépatite C  |
| VIH      | Virus de l'immunodéficience humaine  |
| VWD      | Maladie de Willebrand, <i>Von Willebrand disease</i> (nomenclature internationale) |
| VWF      | Facteur Willebrand, <i>von Willebrand factor</i> (nomenclature internationale)     |
| VWF:Ag   | Antigène du facteur Willebrand   |
| VWF:CB   | Capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène                             |
| VWF:RCo  | Activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand                         |
| VWF-CP   | <i>VWF-cleaving protease</i> , Protéase de clivage du facteur Willebrand           |
| VWF-BPM  | Multimères de bas poids moléculaire du facteur Willebrand                          |
| VWF-PMI  | Multimères de poids moléculaire intermédiaire du facteur Willebrand                |
| VWF-HPM  | Multimères de haut poids moléculaire du facteur Willebrand                         |
| VWF-TPHM | Multimères de très haut poids moléculaire du facteur Willebrand                    |

# INTRODUCTION

## I. Le couple facteur Willebrand/ADAMTS13

### 1. Facteur Willebrand

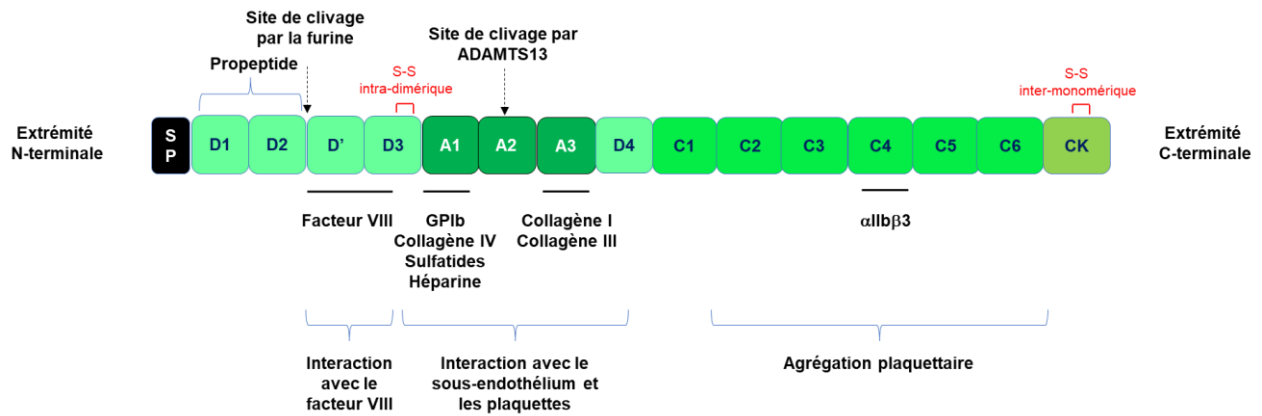
En 1926, le médecin finlandais Erik Von Willebrand a rapporté l'histoire d'une jeune patiente de 5 ans atteinte d'une diathèse hémorragique cutanéomuqueuse sévère. Son histoire familiale, marquée par une consanguinité importante et de nombreux antécédents familiaux d'hémorragies sévères chez des parents de sexe masculin et féminin, l'a conduit à décrire une nouvelle entité de maladie hémorragique constitutionnelle nommée initialement « pseudohémophilie héréditaire »<sup>1</sup> puis maladie de Willebrand (*Von Willebrand disease*, VWD). Près de 50 années de recherche ont été nécessaires pour isoler la protéine responsable de cette pathologie, le facteur Willebrand (*von Willebrand factor*, VWF, nomenclature internationale)<sup>2</sup>.

#### a) Biosynthèse

La protéine VWF a été isolée en 1973 par Legaz *et al*<sup>3</sup> puis caractérisée en 1975 par Gralnick *et al*<sup>4</sup>. Le gène codant pour le VWF a été cloné en 1985<sup>5-8</sup>. Le gène *VWF* (MIM, *Mendelian inheritance in man*, :613160), localisé sur le chromosome 12 (12p13.3), comprend 52 exons représentant 178 kb. Les exons 2 à 3 encodent le peptide signal, les exons 3 à 18 encodent le propeptide tandis que les exons 19 à 52 codent pour la sous-unité mature de VWF ainsi que la zone 3' non traduite<sup>9</sup>. L'ARN messager transcrit correspondant représente 9 kb, traduit en un monomère de 2813 acides aminés (aa) appelé pré-pro-VWF, comprenant pour chaque polypeptide un peptide signal de 22 aa, un propeptide de 741 aa et un monomère mature de VWF de 2050 aa<sup>10</sup>. Le VWF est synthétisé dans les cellules endothéliales<sup>11</sup> et dans les mégacaryocytes<sup>12</sup>.

#### b) Structure primaire

Le VWF est une glycoprotéine qui a la particularité d'être constituée d'un assemblage de monomères en multimères dont la taille varie du simple dimère aux multimères de très hauts poids moléculaires (TPHM), pouvant atteindre 20 kDa<sup>13,14</sup>. La structure primaire du VWF, décrite pour la première fois en 1986<sup>10</sup>, a été révisée grâce aux progrès de la biologie structurale par Zhou *et al* en 2012<sup>15</sup>. L'organisation d'un pré-pro-peptide de VWF en domaines est la séquence suivante : Peptide Signal-D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK, le pro-peptide correspondant aux domaines D1-D2 et le monomère de VWF mature à la séquence D'-CK (**Figure 1**). Le VWF est une protéine riche en cystéine (8,3%)<sup>16</sup> et des ponts disulfures nécessaires à l'assemblage sont retrouvés en position N-terminale (multimérisation des dimères, domaine D3)<sup>17</sup> ou C-terminale (dimérisation des monomères, domaine CK)<sup>18</sup>.



**Figure 1. Structure primaire en domaines d'un monomère de facteur Willebrand et sites de liaison avec ses principaux ligands (d'après Zhou et al., Blood, 2012)**

### c) Modifications post-traductionnelles

Après clivage du peptide signal par une furine dans le réticulum endoplasmique ( $\text{pH} \approx 7,4$ ), chaque propeptide de VWF est dimérisé par son extrémité C-terminale *via* des ponts disulfures tandis que les sous-unités de VWF sont fortement N-glycosylées<sup>19</sup>. Après migration dans l'appareil de Golgi, le pH un peu plus acide ( $\text{pH} \approx 6,2$ ) et la forte concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  favorisent l'alignement des dimères de pro-VWF puis leur assemblage en multimères par l'extrémité C-terminale (domaines D'D3)<sup>20,21</sup>. Une étude récente de Zeng et al<sup>22</sup> souligne l'importance du propeptide dans l'étape de multimérisation. A pH acide, deux propeptides formeront un homodimère par interaction de leurs domaines D2, entraînant la formation d'un homodimère « en bouquet » entrelacé D1D2D'D3, et l'alignement face à face des domaines D3, facilitant la formation d'un pont disulfure et donc la multimérisation. Les multimères de VWF sont compactés sous la forme d'une hélice dont le creux de 28 nm de diamètre<sup>22</sup> est constitué des domaines D1-D2 (propeptide) et D'D3, tandis que le reste de la protéine (domaines A1-CK) est orienté vers l'extérieur<sup>16</sup> (**Figure 2**). Les multimères résultants sont de taille très variable, allant du simple dimère à des multimères comprenant plus de 60 sous-unités<sup>23</sup>. Selon leur taille, ils sont classés en multimères de bas poids moléculaires (VWF-BPM, <5-mers), multimères de poids moléculaire intermédiaire (VWF-PMI, 6-10 mers), multimères de haut poids moléculaire (VWF-HPM, 11-15 mers) ou multimères de très haut poids moléculaire (VWF-THPM, > 15-mers). Le VWF subit alors une nouvelle série de glycosylation, par maturation des résidus N-glycosylés et addition de résidus O-glycosylés.<sup>19,24</sup>. Au total, la protéine VWF est fortement glycosylée puisque près de 20% de sa masse provient des oligosaccharides<sup>25</sup>, la plupart coiffée de dérivés de l'acide sialique<sup>26</sup>. D'autre part, la proportion et la composition en oligosaccharide du VWF diffère selon son site de biosynthèse (cellules endothéliales ou mégacaryocytes<sup>27</sup>).

## Monomère de VWF

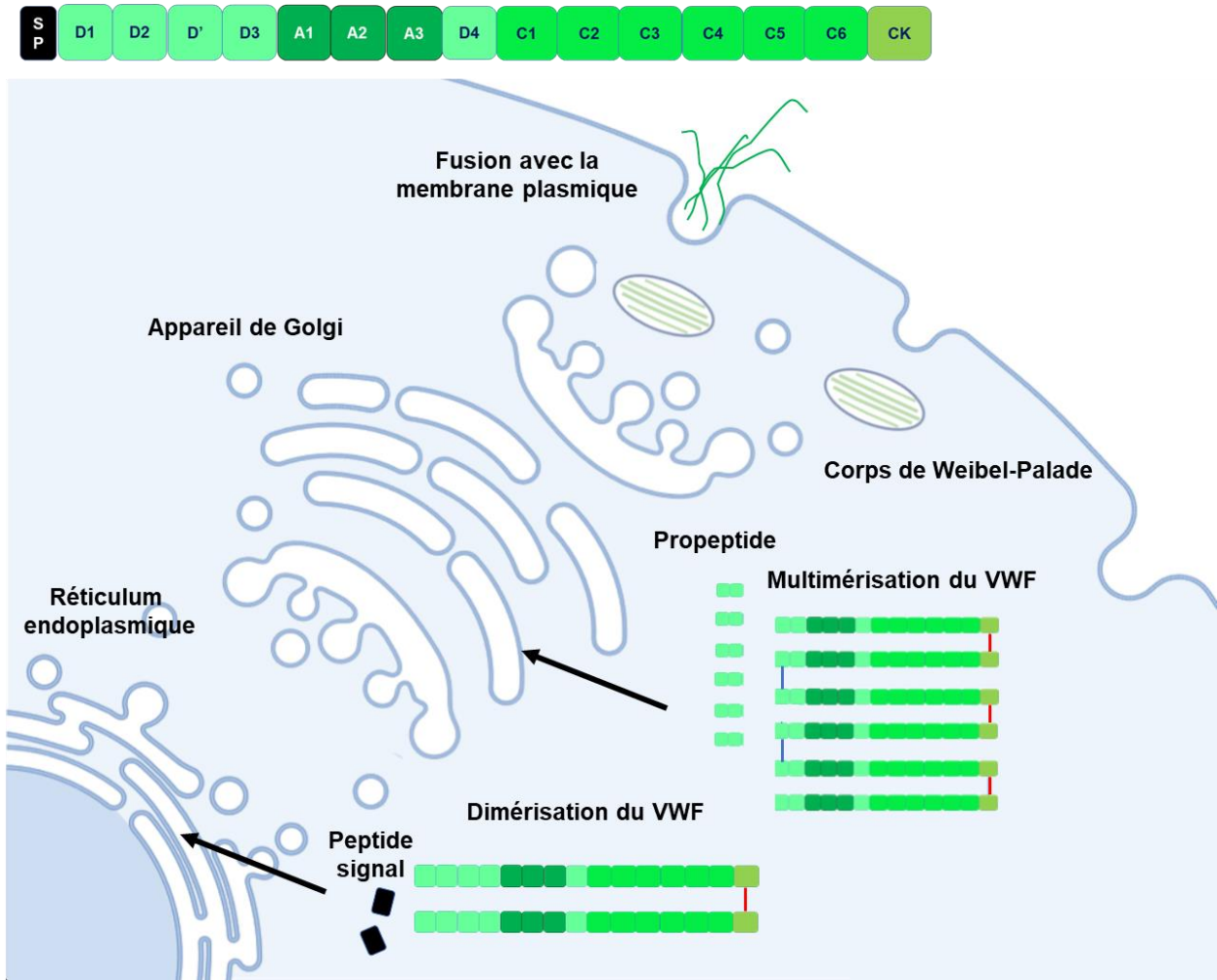


Figure 2. Processus de dimérisation puis de multimérisation du facteur Willebrand.

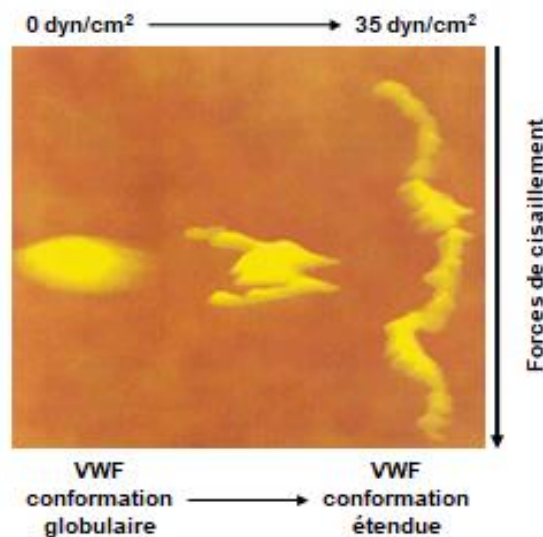
### d) Stockage et sécrétion

Les multimères de VWF sont stockés dans les granules alpha des mégacaryocytes/plaquettes<sup>12</sup> et dans des vésicules de stockage appelées corps de Weibel Palade dans les cellules endothéliales<sup>28</sup>, permettant l'exocytose des multimères du VWF dans la circulation en cas de brèche vasculaire<sup>29,30</sup>. Contrairement aux granules alpha, la biosynthèse des corps de Weibel Palade dépend intimement de la présence de VWF<sup>31-33</sup>. Ces organelles allongés contiennent des multimères de VWF de taille variable, organisés de façon condensée sous forme de tubules hélicoïdaux<sup>34</sup>. La biosynthèse et l'exocytose des corps de Weibel Palade sont fortement dépendantes de protéines appartenant à la famille des SNAREs (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*)<sup>30,35-38</sup>. Le propeptide, essentiel à la formation des corps de Weibel Palade ainsi qu'à leur transport intracellulaire<sup>39,40</sup>, est clivé et séparé du VWF mature lors de l'exocytose<sup>23</sup>. Le VWF plasmatique provient majoritairement des cellules endothéliales. La fusion des corps de Weibel Palade à la membrane cellulaire conduit à la sécrétion de VWF dans la circulation (pôle apical) ou au niveau sous-endothélial suite à divers stimuli (brèche vasculaire, forces de cisaillement, histamine, cytokines pro-inflammatoires)<sup>16,41,42</sup>. A l'inverse,

le VWF d'origine mégacaryocytaire constitue une part minoritaire du VWF plasmatique et il est sécrété par les granules alpha après stimulation par un agoniste plaquettaire (thrombine ou ADP)<sup>16</sup>. La concentration plasmatique de VWF est de l'ordre de 5 à 10 µg/mL<sup>3</sup>.

#### e) Sensibilité aux forces de cisaillement et régulation par ADAMTS13

Le VWF est une protéine multimérique dont la conformation dépend intimement des forces de cisaillement auxquelles elle est contrainte<sup>43</sup>. Dans la circulation sanguine (vaisseaux de gros et de moyen calibres), le VWF adopte spontanément une conformation globulaire limitant son interaction avec les plaquettes<sup>44,45</sup>. Dans la microcirculation artério-capillaire, les forces de cisaillement élevées du flux sanguin induisent un changement de conformation du VWF, qui adopte alors une conformation étendue<sup>46,47</sup> (**Figure 3**). Cette conformation expose notamment le site cryptique de liaison à la glycoprotéine Iba plaquettaire (GPIIb) au sein du domaine A1<sup>48</sup>.

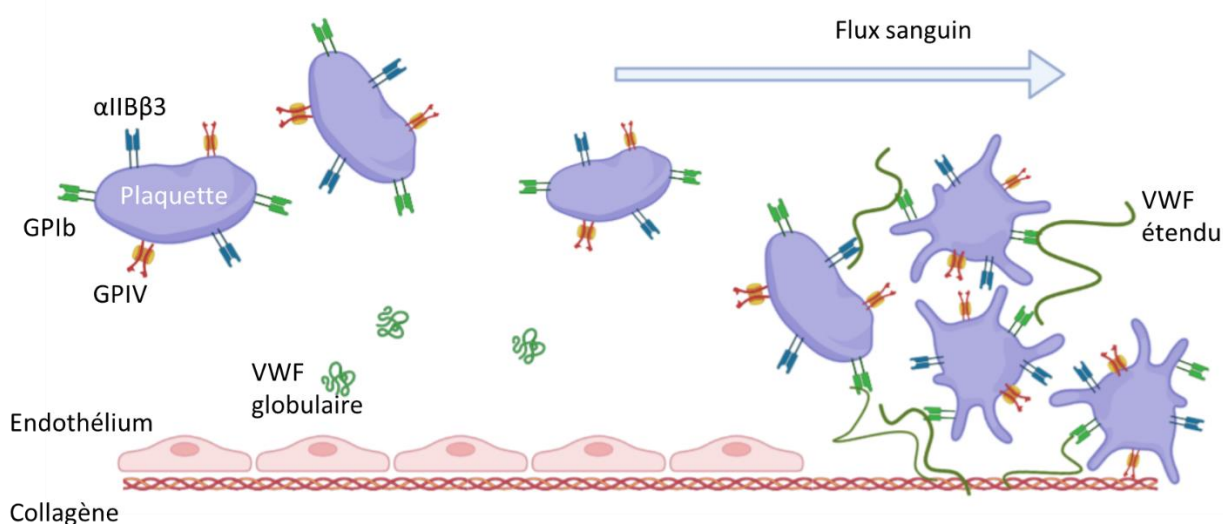


**Figure 3. Sensibilité du facteur Willebrand aux forces de cisaillement (d'après Siedlicki et al., Blood, 1996)**

La protéase ADAMTS13 (*A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13*) régule également l'interaction du VWF aux plaquettes en clivant spécifiquement le VWF en conformation étendue au niveau du pont peptidique Tyr1605-Met1606 situé dans le domaine A2. Ce pont peptidique n'est pas accessible lorsque le VWF adopte une conformation globulaire<sup>49,50</sup> (**Figure 4**). Cette régulation de la taille des multimères du VWF impacte directement son pouvoir adhésif vis-à-vis des plaquettes et prévient la formation de microthrombi dans la microcirculation<sup>51</sup>. A contrario, des mutations du domaine A2 peuvent conduire à une sensibilité excessive à la protéolyse du VWF par ADAMTS13 et à la perte de VWF-HPM, caractéristique d'un variant qualitatif de maladie de Willebrand, le variant VWD-2A (IIA)<sup>52,53</sup>.

#### f) Fonctions du facteur Willebrand dans l'hémostase primaire et la coagulation

Le VWF est une protéine-clé de l'hémostase. Les forces de cisaillement élevées de la microcirculation sanguine permettent l'élongation du VWF et l'exposition de son site de liaison à la GPIb $\alpha$  plaquettaire (composée d'une chaîne  $\alpha$  encodée par le gène *GPIBA* et d'une chaîne  $\beta$  encodée par le gène *GPIBB*). Le VWF possède également plusieurs sites de liaison au collagène, situés dans les domaines A1 et A3 et lui permettant de se fixer au sous-endothélium lors d'une brèche vasculaire<sup>15</sup>. La capacité de liaison du VWF au collagène dépend intimement de l'intégrité de ses domaines A1 et A3 mais aussi de son degré de multimérisation<sup>54,55</sup>. Le VWF permet donc le recrutement et l'adhésion irréversible des plaquettes au sous-endothélium lésé. Il participe à l'agrégation plaquettaire par le biais de son récepteur à la glycoprotéine  $\alpha_{IIb}\beta_{III}$  (composée de l'intégrine  $\alpha_{IIb}$  encodée par le gène *ITGA2B* et de l'intégrine  $\beta_{III}$  encodée par le gène *ITGB3*) localisé au niveau du domaine C4 (séquence RGD). Le rôle central du VWF dans la formation du thrombus plaquettaire est d'autant plus marqué que les multimères de VWF sont de taille importante (augmentation du nombre de sites de liaison pour les plaquettes et le collagène ; sensibilité accrue aux forces de cisaillement élevées du flux sanguin optimisant le passage d'une conformation globulaire à étendue)<sup>56</sup> (Figure 4).



**Figure 4. Le facteur Willebrand dans l'hémostase primaire (d'après Leebeek et al., N. Engl. J. Med., 2016) .**

Le VWF transporte le facteur VIII (FVIII) de la coagulation dans la circulation, stabilise sa structure hétérodimérique et le protège de la dégradation, en particulier vis-à-vis du système de la protéine C activée et du facteur X activé<sup>57-59</sup>. Le site de liaison du VWF au facteur VIII se situe au niveau du domaine D'D3<sup>15</sup> et implique une liaison non covalente rompue par la thrombine générée au cours du processus de coagulation.



### **g) Clairance**

Le temps de demi-vie du VWF est de l'ordre de 12 heures. Plusieurs paramètres peuvent modifier la clairance (et donc la concentration plasmatique) du VWF, en particulier les différents profils de glycosylation de cette protéine associés au groupe sanguin ABO<sup>25</sup>. Les sujets de groupe sanguin O ont classiquement une concentration plasmatique de VWF environ 25% moindre que les sujets non-O, en lien avec une clairance augmentée. La clairance du VWF fait intervenir plusieurs effecteurs cellulaires : les macrophages, les cellules endothéliales et les hépatocytes. Plusieurs récepteurs au VWF participant activement à sa clairance ont été identifiés et caractérisés, notamment CLEC4M (*C-type lectin domain family 4 member M*), LRP1 (*Low density lipoprotein receptor-related protein 1*), MGL (*Monoacylglycerol lipase*), MSR1 (*Macrophage scavenger receptor 1*) et ASPGR (*Asialoglycoprotein receptors*)<sup>60-64</sup>.

## **2. ADAMTS13**

La découverte et la caractérisation d'ADAMTS13 sont intimement liées à l'étude d'une pathologie thrombotique de la microcirculation causée par son déficit fonctionnel sévère, le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). En 1982, Moake montre dans une étude déterminante l'accumulation de VWF-HPM dans le plasma des patients atteints de PTT et formule l'hypothèse d'un défaut de maturation du VWF<sup>65</sup>. Près de 15 ans plus tard, la protéase de clivage du facteur Willebrand (VWF-CP) est isolée, purifiée et caractérisée par deux équipes indépendantes<sup>51,66</sup>. Le gène *ADAMTS13* est cloné pour la première fois en 2001<sup>67,68</sup> et la VWF-CP est identifiée comme étant le 13<sup>ème</sup> membre de la famille des protéases ADAMTS (*A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif*)<sup>69-71</sup>.

### **a) Biosynthèse, sécrétion et modulation**

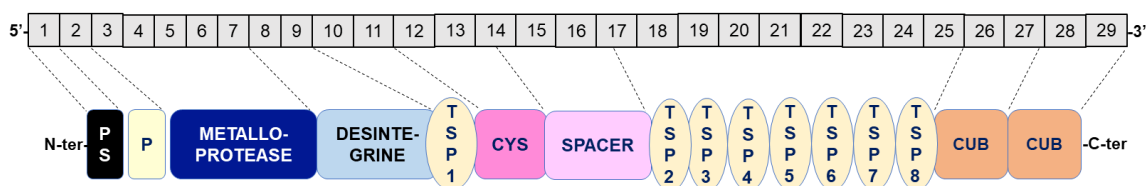
Le gène *ADAMTS13* (MIM 274150) est localisé sur le bras court du chromosome 9 (9q34.2) et contient 29 exons pour une taille de 37 kb<sup>67</sup>. Ce gène a la particularité d'être modulé par épissage alternatif et de posséder trois isoformes. L'isoforme de référence (NM\_139025.5) correspond à un transcrit d'ARNm de 4,9 kb encodant pour une protéine monocaténaire de 1427 aa correspondant à la pro-ADAMTS13, c'est-à-dire un propeptide associé à une protéine ADAMTS13 mature. Les isoformes NM\_139026.6 (codant pour une protéine de 1340 aa) et NM\_139027.6 (codant pour une protéine de 1371 aa) sont minoritaires<sup>67,72</sup>. L'étude de l'expression d'ARNm sur des tissus humains montre une expression importante de l'activité d'ADAMTS13 dans le foie et les ovaires, mais également de façon moindre dans le rein, le thymus, les intestins, les leucocytes, la prostate et le cerveau<sup>67,73</sup>. Toutefois, la biosynthèse et la sécrétion d'ADAMTS13 fonctionnelle n'a été mise en évidence que dans un groupe restreint de tissus : les cellules stellaires hépatiques<sup>70,74,75</sup>, les cellules endothéliales<sup>76</sup>, les plaquettes<sup>77</sup>, les podocytes<sup>78</sup> rénaux, les cellules endothéliales des tubules rénaux<sup>79</sup> et le placenta (en particulier au premier trimestre de grossesse)<sup>80</sup>. ADAMTS13 est sécrétée sous forme soluble et, à l'heure actuelle, aucun transporteur protéique et aucun inhibiteur physiologique n'ont été identifiés pour cette protéine. Une proportion minimale d'ADAMTS13 (3 à 5%) circule fixée sur le VWF sans entraîner son clivage<sup>81</sup>. La concentration plasmatique moyenne est d'environ 1 µg/mL<sup>71</sup> avec un temps de demi-vie estimé entre 2 et 3 jours<sup>82</sup>. ADAMTS13 peut, dans une certaine mesure, être dégradée par plusieurs protéines *in vivo* (thrombine, plasmine, hémoglobine libre, cytokines pro-inflammatoires ...) <sup>83,84</sup>. La bilirubine libre inhibe

le clivage du VWF par ADAMTS13 sans le dégrader<sup>85</sup>. D'autre part, des variations physiologiques d'ADAMTS13 sont décrites, en regard de l'évolution des concentrations plasmatiques de VWF, notamment aux âges extrêmes de la vie où l'activité d'ADAMTS13 est diminuée d'environ 20% par rapport à la population adulte. Au cours de la grossesse, la concentration plasmatique d'ADAMTS13 diminue progressivement dès le premier trimestre et jusqu'au post-partum, de 20 à 40% du taux de base, parallèlement à l'augmentation des taux de VWF qui peut être très importante à terme (>200 UI/dL d'antigène du VWF, VWF:Ag)<sup>86</sup>. Les sujets appartenant à l'ethnie noire (Afrique subsaharienne, Antilles) ont également des taux physiologiques d'ADAMTS13 un peu plus bas que les autres ethnies, de l'ordre de 20%<sup>87</sup>.

### b) Structure primaire

La pré-pro-ADAMTS13 encodée par l'isoforme principale du transcrit NM\_139025.4 du gène *ADAMTS13* est une protéine monocaténaire de 1427 aa, comprenant un peptide signal (correspondant à l'exon 1 et d'une taille de 33 aa), un propeptide (correspondant à l'exon 2 et d'une taille de 41 aa) clivé par une furine<sup>88</sup> et libérant une protéase ADAMTS13 mature de 1353 aa et d'une masse de 145 kDa<sup>68</sup>. La structure de cette protéine est similaire aux autres membres de la famille ADAMTS et se compose d'un domaine métalloprotéase siège de son activité catalytique (exons 3 à 7, aa 75 à 290), suivi d'un domaine désintégrine (exons 8 à 9, aa 291 à 385), d'un premier domaine thrombospondine 1 (TSP1) (exons 10 à 11, aa 386 à 439), d'un domaine riche en cystéines (exons 12 à 14, aa 440 à 555), d'un domaine *spacer* (exons 14 à 17, aa 556 à 685), d'une succession de sept domaines TSP1 (exons 17 à 25, aa 686 à 1191) puis de deux domaines CUB (*Complement protein subcomponents C1r/C1s, Urchin embryonic growth factor and Bone morphogenetic protein 1*) (exons 26 à 29, aa 1192 à 1427) à l'extrémité C-terminale<sup>73,89,90</sup>. ADAMTS13 a toutefois deux particularités structurales par rapport aux autres protéines ADAMTS : son court propeptide et la présence de domaines CUB<sup>91</sup> (**Figure 5**).

#### Exons du gène *ADAMTS13*



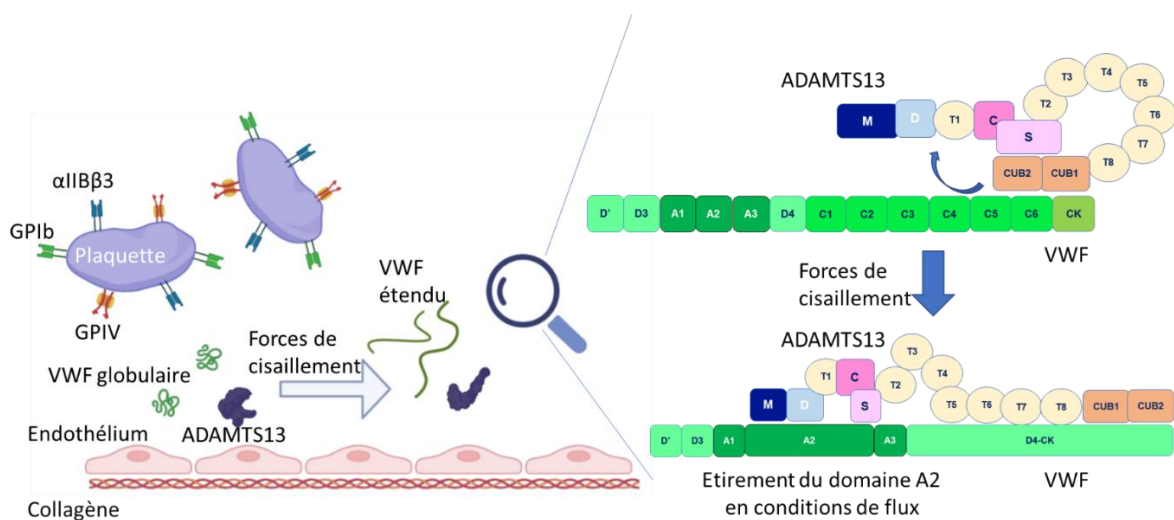
#### Domaines de la protéine ADAMTS13

**Figure 5. Relations exons-domaines de la protéine ADAMTS13 (d'après Zheng et al., J. Biol. Chem., 2001).**

### c) Fonction

La fonction d'ADAMTS13 est de réguler le pouvoir adhésif du VWF vis-à-vis des plaquettes en clivant spécifiquement ses multimères de HPM. C'est un couple enzyme substrat de très haute spécificité, ADAMTS13 n'étant pas capable de cliver d'autres protéines de l'hémostase telles que le fibrinogène

par exemple<sup>91</sup>. Des sites de liaisons situés dans le domaine CUB d'ADAMTS13 reconnaissent spécifiquement des épitopes situés dans le domaine D4-CK du VWF<sup>92,93</sup> permettant l'ouverture et le déploiement d'ADAMTS13 le long du VWF avec de nombreux sites de liaison, notamment au niveau des domaines *spacer*, désintégrine et du domaine riche en cystéine (modèle de « fermeture éclair moléculaire »)<sup>92,94,95</sup> (**Figure 6**). Le clivage du VWF est effectué grâce au domaine métalloprotéase qui reconnaît et clive spécifiquement le pont peptidique Tyr1605-Met1606, site cryptique localisé dans le domaine A2 et rendu accessible par l'élongation induite par des forces de cisaillement élevées. Le domaine métalloprotéase possède des sites de fixation au calcium et au zinc, indispensables à son activité catalytique<sup>96</sup>. ADAMTS13 est biologiquement capable de cliver le VWF plasmatique ainsi que le VWF lié aux plaquettes (par le biais d'une liaison à la GPIIb $\alpha$  ou à l' $\alpha$ IIb $\beta$ III plaquettaire) au sein d'un thrombus, suggérant un rôle de régulation négative d'ADAMTS13 à l'extension du thrombus<sup>91</sup>.

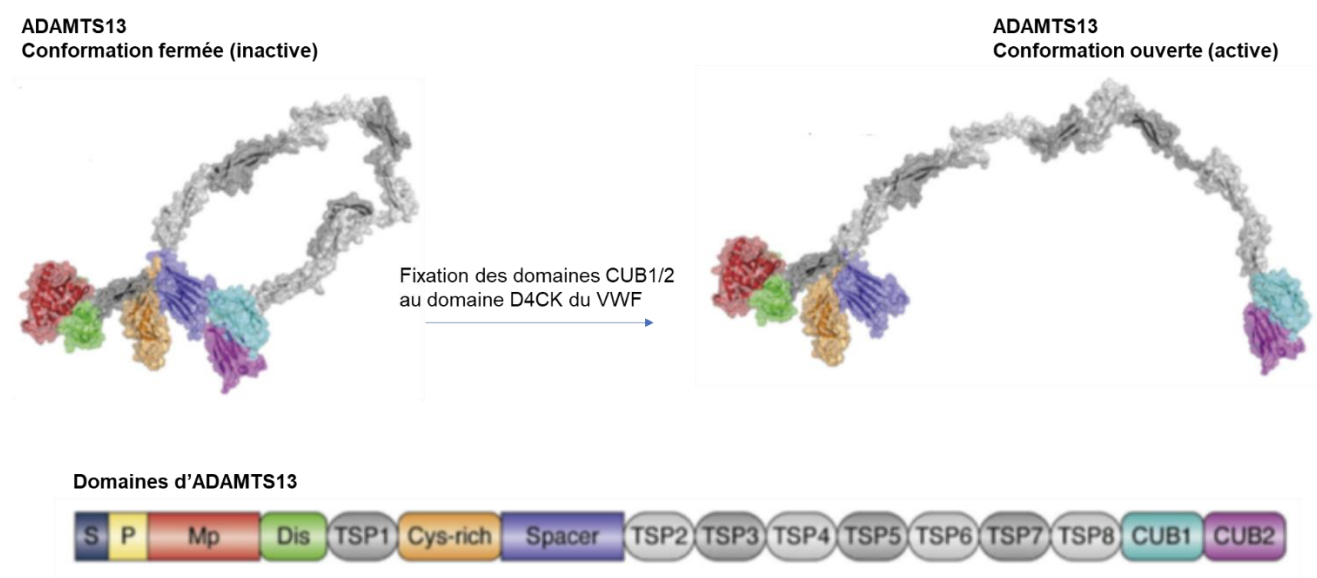


**Figure 6. Clivage du facteur Willebrand par ADAMTS13 : la fermeture éclair moléculaire (d'après Petri et al., Nat. Comm., 2019)**

#### d) Conformation d'ADAMTS13

ADAMTS13 est une protéase nécessitant une activation allostérique par une reconnaissance et une liaison à son substrat, le VWF<sup>92,97-99</sup>. Physiologiquement, ADAMTS13 circule dans une conformation « fermée », repliée sur elle-même, par une interaction entre son domaine *spacer* et son domaine distal C-terminal TSP1-8-CUB2<sup>100,101</sup>. Ce phénomène d'auto-inhibition permet de réguler l'activité d'ADAMTS13 et de prévenir un clivage excessif et non contrôlé du VWF. La reconnaissance et la liaison du domaine D4CK du VWF à l'extrémité N-terminale d'ADAMTS13 permet la levée de l'auto-inhibition d'ADAMTS13 et son « déploiement » (conformation ouverte). Cette conformation ouverte permet une interaction entre des sites de liaison situés dans les domaines désintégrine, *spacer* et le domaine riche en cystéine d'ADAMTS13 et des épitopes cryptiques localisés dans le domaine A2 du VWF<sup>97</sup>. De nombreux motifs indispensables à cette auto-inhibition et au maintien de la conformation fermée d'ADAMTS13 ont été identifiés, en particulier dans le domaine *spacer*<sup>102-104</sup>, le domaine CUB1<sup>93,105</sup> et TSP1-8<sup>97,98,106</sup>. Le domaine CUB2, a contrario, ne semble pas nécessaire au maintien d'ADAMTS13 en

conformation fermée et la caractérisation d'une ADAMTS13 recombinante tronquée de son domaine CUB2 montre une activité biologique similaire à une ADAMTS13 sauvage<sup>101</sup>. Ce domaine semble toutefois impliqué dans la régulation de l'activité d'ADAMTS13 puisque l'ajout d'un anticorps monoclonal anti-CUB2 se traduit par une augmentation de l'activité protéolytique d'ADAMTS13<sup>100</sup>. Par ailleurs, Petri et al<sup>92</sup> ont mis en évidence le rôle inhibiteur du site catalytique du domaine métalloprotéine par une triade d'aa, Arg193, Asp217 et Asp252 (« *gatekeeper triad* »), formant un pont salin rendant le site catalytique inaccessible. Cette inhibition est maintenue lorsque la conformation d'ADAMTS13 est fermée. La liaison au pont peptidique Tyr1605-Met1606 du VWF déstabilise ce pont salin et rend accessible et fonctionnel le site catalytique d'ADAMTS13. Le changement conformationnel d'ADAMTS13 induit par la reconnaissance et la liaison au VWF est donc également une étape nécessaire à l'activation du domaine métalloprotéase. Dans une étude récente de biologie structurale, Del Amo-Maestro et al<sup>107</sup> montre que cette « fermeture éclair moléculaire » repose sur de nombreuses liaisons de faible et forte affinité, et soulignent le caractère hautement flexible de la protéine ADAMTS13. Le couple VWF-ADAMTS13 est donc un modèle enzyme-substrat de très haute spécificité où le substrat (VWF) active spécifiquement son enzyme (ADAMTS13) et régule donc sa propre protéolyse (**Figure 7**).



**Figure 7. Conformation d'ADAMTS13 : d'une conformation physiologique « fermée » à une conformation « ouverte » par activation allostérique (d'après Ercig et al., J. Biol. Chem., 2021).**

## II. Le purpura thrombotique thrombocytopénique

### 1. Historique

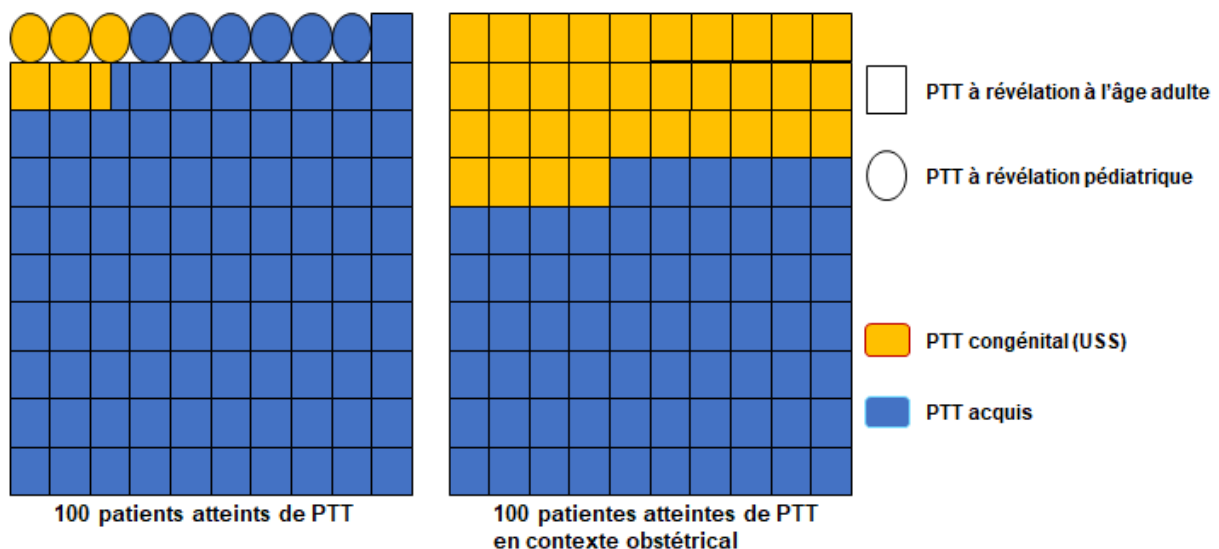
Deux ans avant qu'Erik Von Willebrand ne décrive la pathologie hémorragique qui porte son nom et a ouvert la voie de l'étude du VWF, un médecin new-yorkais, Eli Moschowitz, a rapporté de l'autre côté

de l'Atlantique l'histoire clinique atypique d'une jeune patiente de 16 ans hospitalisée pour l'association de plusieurs symptômes : fièvre, pétéchies, paralysie de l'hémicorps gauche évoluant vers un coma. L'autopsie de la patiente a révélé de multiples thrombi hyalins dans la rate, le cœur et les reins. Cette présentation clinique dramatique dont la physiopathologie échappe à la compréhension des médecins à cette époque a été appelée syndrome de Moschowitz<sup>108</sup>. Une vingtaine d'années plus tard, Singer *et al* ont rapporté une observation similaire et ont proposé la terminologie de purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT)<sup>109</sup>. Ultmann et Amorosi ont publié en 1966 une série de 16 observations personnelles et 255 observations issues de la littérature, permettant de définir une pentade de signes cliniques et biologiques caractéristiques du PTT : fièvre, atteinte neurologique transitoire ou permanente, atteinte rénale, thrombopénie avec purpura et anémie hémolytique avec présence de schizocytes sur le frottis sanguin<sup>110</sup>. Le pronostic de cette pathologie est extrêmement sombre (survie de l'ordre de 10%). Dans les années 1960 et 1970, des publications du pédiatre américain Irving Schulman<sup>111</sup> et de l'hématologue américain Jefferson Upshaw<sup>112</sup> ont suggéré pour la première fois d'une part que cette pathologie peut résulter d'une anomalie congénitale, nommée syndrome d'Upshaw-Schulman (USS), et d'autre part qu'elle peut être la conséquence du déficit d'une protéine plasmatique. Plusieurs études ont montré que la perfusion de plasma a permis une amélioration clinique notable voire une rémission et a transformé le pronostic de cette pathologie, renforçant l'hypothèse d'un déficit – congénital ou acquis – d'une protéine liée au VWF dans la physiopathologie du PTT<sup>113–115</sup>. En 1982, Moake *et al*<sup>65</sup> ont fait une avancée majeure en mettant en évidence une accumulation de VWF-THPM dans le plasma des patients atteints de PTT, connectant pour la première fois cette pathologie à une anomalie liée au VWF. L'étude immunohistochimique des microthrombi retrouvés chez les patients atteints de PTT a mis en évidence une composition riche en VWF et en plaquettes<sup>116</sup>. L'isolement, la purification et la caractérisation de la protéase de clivage du VWF, ADAMTS13, a permis finalement d'élucider la physiopathologie du PTT<sup>51,66</sup>. La première méthode fonctionnelle de dosage de l'activité d'ADAMTS13 a été développée en 1997 par Furlan<sup>117</sup> et a permis de souligner le caractère spécifique d'un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 (activité effondrée, < 10 UI/dL) dans le PTT, confirmé rétrospectivement sur plusieurs cohortes nationales<sup>118,119</sup>. Des auto-anticorps dirigés contre la protéase ADAMTS13 ont été mis en évidence en 1998<sup>120,121</sup>, soulignant le caractère le plus fréquemment acquis auto-immun de cette pathologie. Enfin, le clonage du gène *ADAMTS13*<sup>67</sup> en 2001 a permis de mettre en évidence des mutations bi-alléliques délétères impliquées dans la forme congénitale du PTT (PTTc). Depuis une vingtaine d'années, la création de différents registres de patients et de centres de référence nationaux, permet de colliger les données épidémiologiques, démographiques, diagnostiques et thérapeutiques relatives à ces patients, et d'ouvrir de nombreux champs dans la compréhension du PTT<sup>122–128</sup>.

## 2. Epidémiologie

Une microangiopathie thrombotique (MAT) est définie par l'association d'une anémie hémolytique mécanique (objectivée par des paramètres biochimiques tels qu'haptoglobine indosable, augmentation de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH), augmentation de la bilirubine libre et/ou par la mise en évidence sur le frottis sanguin d'une anomalie morphologique particulière des globules

rouges, les schizocytes), d'une thrombopénie périphérique de consommation et d'une obstruction de la microcirculation sanguine par des microthrombi<sup>129</sup>, entraînant une défaillance d'organe de sévérité variable<sup>130</sup>. La terminologie « MAT » regroupe un ensemble d'entités présentant des caractéristiques cliniques et biologiques similaires mais reposant sur des physiopathologies extrêmement différentes et nécessitant donc des prises en charge spécifiques. L'étude du registre des patients du Centre National de Référence des MicroAngiopathies Thrombotiques (CNR-MAT) permet d'estimer la prévalence du PTT à 13 cas par million d'habitants<sup>131</sup>. L'incidence du PTT acquis auto-immun (PTTi) et du PTT congénital (PTTc ou syndrome d'Upshaw-Schulman, USS) ont été respectivement estimés à 3-6 cas par million d'habitants par an<sup>123,132</sup> et à 0,4-1 cas par million d'habitants par an<sup>133</sup>. A titre de comparaison, les incidences de deux autres grandes entités appartenant à la famille des MAT, le syndrome hémolytique et urémique (SHU) associé à un *Escherichia coli* producteur de shigatoxine (SHU-STEC) et le SHU atypique (SHUa) associé à des anomalies du complément sont respectivement estimés à 6-170 cas par million d'habitants par an<sup>134</sup> et à 0,2-2 cas par million d'habitants par an<sup>135</sup>. Le PTT est très majoritairement une pathologie acquise (>95% des cas), auto-immune et médiée par des auto-anticorps d'isotype G (immunoglobulines G, IgG) dirigés contre ADAMTS13<sup>121,136</sup>. Dans ce cadre nosologique, le PTTi touche très majoritairement l'adulte (>95% des cas), en particulier les femmes (sexe-ratio : 2F/1H) avec un âge médian au diagnostic de l'ordre de 40 ans<sup>131</sup>. A contrario, le diagnostic de PTTc est beaucoup plus rare (<5% des cas) et plus fréquent dans la cohorte pédiatrique de PTT (environ 30%)<sup>131,137</sup> que chez l'adulte (environ 3%), où la quasi-totalité des cas rapportés sont liés à un contexte obstétrical<sup>131,138</sup>, bien que d'exceptionnelles observations hors contexte obstétrical aient été publiées<sup>139-141</sup> (**Figure 8**).



**Figure 8. Epidémiologie du purpura thrombotique thrombocytopénique : représentation de 100 patients en fonction de l'âge au diagnostic et du mécanisme du déficit sévère en ADAMTS13.**

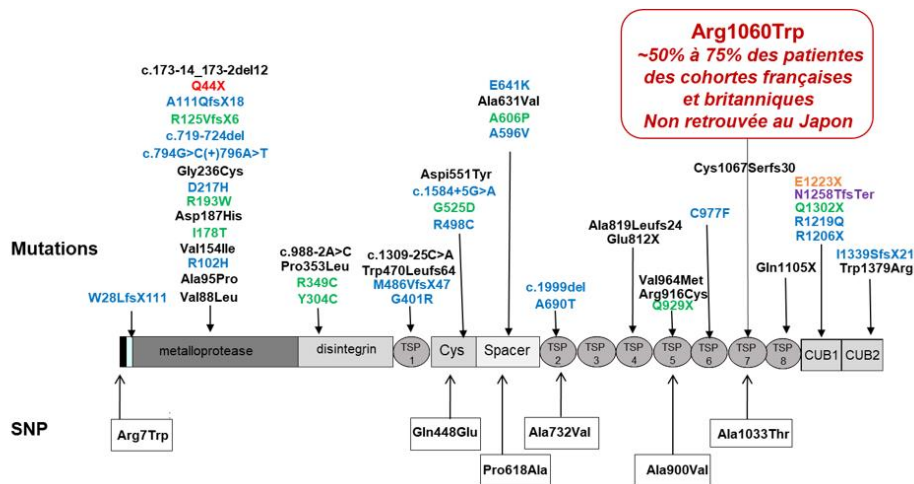
### 3. Physiopathologie

Le PTT est une forme particulière de MAT définie par un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 (activité d'ADAMTS13 < 10 UI/dL). Ce déficit conduit à un défaut de clivage des VWF-HPM et VWF-THPM, qui fixent spontanément les plaquettes dans les conditions rhéologiques de la microcirculation associées à des taux de cisaillement élevés du flux sanguin et forment des microthrombi responsables de l'atteinte d'organe<sup>142</sup>. Plusieurs mécanismes pathologiques peuvent conduire à ce déficit fonctionnel sévère.

#### a) Forme congénitale de purpura thrombotique thrombocytopénique

Le PTTc (USS, *Online Mendelian Inheritance in Man* 274150) est une entité très rare (<5% des cas de PTT) associée à la présence de mutations bi-alléliques délétères du gène *ADAMTS13*. C'est une pathologie monogénique de transmission autosomique récessive<sup>67</sup>. La présentation biologique diffère sensiblement par rapport au PTT acquis puisque chez les patients PTTc, l'activité d'ADAMTS13 est constamment indétectable et il n'est jamais mis en évidence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13. En 2022, plus de 200 mutations délétères réparties sur l'ensemble du gène *ADAMTS13* ont été identifiées chez des patients PTTc, avec par ordre de fréquence des mutations faux-sens (~60%), des délétions/insertions (~18%), des mutations non-sens (~12,5%) et des mutations touchant aux sites d'épissage (~8%)<sup>131,137,143-147</sup>. Aussi, plusieurs polymorphismes associés à des modulations de l'activité d'ADAMTS13 pourraient également jouer un rôle pathologique<sup>148-150</sup>. La majorité des mutations retrouvées sont privées et intra-familiales, mais deux mutations plus fréquentes sont rapportées : la duplication c.4143\_4144dupA et la R1060W. La duplication c.4143\_4144dupA dans l'exon 29 a une fréquence estimée entre 0,04% et 0,3% en Europe centrale et en Scandinavie<sup>146,151-153</sup>. La mutation faux-sens, R1060W (exon 24) présente une répartition géographique un peu plus large elle est retrouvée en Europe et au Royaume-Uni, mais ni en Égypte ni au Japon<sup>138,154-156</sup>. La caractérisation biochimique de la variation de séquence R1060W d'ADAMTS13 à l'état homozygote dans des ADAMTS13 recombinantes montre une activité protéolytique conservée mais une rétention intracellulaire quasi-totale d'ADAMTS13. A ce jour, aucun facteur de risque constitutionnel (hors gène *ADAMTS13*) n'est connu comme associé au PTTc. Le PTTc est une maladie très hétérogène pour laquelle il existe une variabilité inter-individuelle importante en termes de sévérité et fréquence des poussées. Toutefois, deux groupes de patients se distinguent en fonction du type de mutation d'*ADAMTS13* et de l'âge de survenue du premier épisode de PTTc<sup>137</sup>. Le PTTc pédiatrique se révèle souvent dans la petite enfance voire en période néo-natale par un ictère néonatal plus ou moins associé à des cytopénies, et le risque de rechute est important. Le PTTc de révélation à l'âge adulte au contraire survient quasiment toujours en contexte obstétrical<sup>138,155,157-159</sup>, avec un risque de rechute négligeable en dehors de la grossesse et une probabilité de rechute de 100% en cas de grossesse non suivie<sup>160</sup>. La **Figure 9** reprend les mutations publiées à ce jour responsables de PTTc de révélation à l'âge adulte.





Fujimura et al, Br J Haematol 2009 - Moatti et al, Blood 2012 - Mariotte et al, Lancet Haematol 2016 - Joly et al, Thromb Haemost 2018 - Scully et al, Blood 2014 - Falter et al, Hamostaseologie, 2014 - Pikovsky et al., Thromb Res 2020 - Xu et al, Clin Hemorheol Microcirc 2021

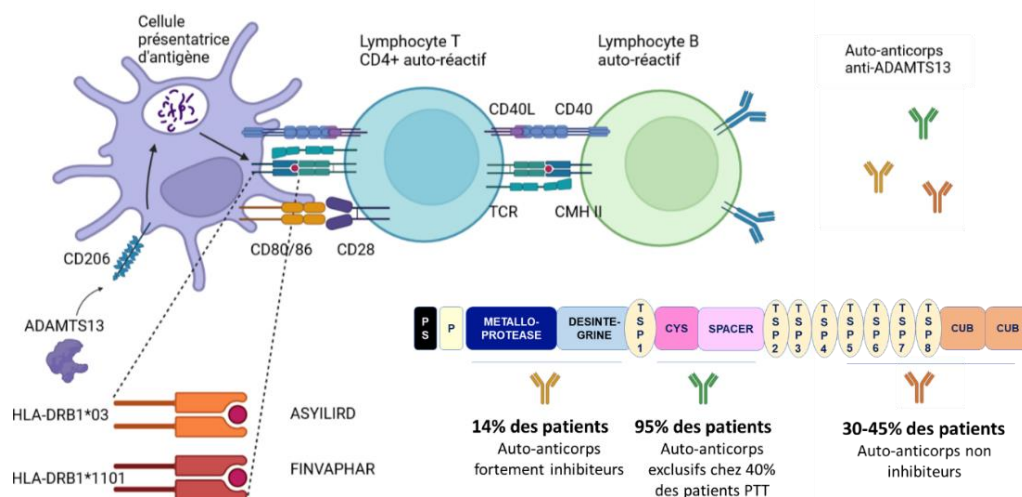
**Figure 9. Gène ADAMTS13 et mutations responsables du purpura thrombotique thrombocytopénique congénital révélé à l'âge adulte.**

### b) Forme acquise de purpura thrombotique thrombocytopénique

Dans la très grande majorité des cas, le PTT est une pathologie acquise auto-immune évoluant par poussées entrecoupées de périodes de rémission de durée variable. Bien que très fréquemment idiopathique (50% des cas), le PTTi peut également être associé à certains contextes cliniques tels que la grossesse<sup>131,161</sup>, les maladies auto-immunes<sup>162</sup>, les infections<sup>163,164</sup>, certains médicaments (notamment le ticagrelor<sup>165</sup> et la vaccination contre la COVID-19 (maladie à coronavirus 2019)<sup>166,167</sup>) et les néoplasies<sup>168</sup>. En 2008, Camilleri et al.<sup>139</sup>, rapportent une prévalence élevée (11,3%) de la mutation R1060W dans le PTT de révélation adulte, incluant vraisemblablement des PTTi, mais aucune autre étude portant sur la recherche de variation de séquence du gène ADAMTS13 dans le PTTi n'a été publiée depuis. Dans une étude récente, Basu et al.<sup>169</sup> ont mis en évidence des variations de séquence des gènes de la famille ANKRD (particulièrement ANKRD6) et des gènes associés à la glycosylation des protéines dans une cohorte de 40 PTTi par séquençage complet d'exome. Cette étude est complétée par une étude phénotypique du profil des glycosylations des protéines plasmatiques, révélant des profils différents entre les PTTi et les contrôles et suggérant un rôle de ces altérations post-traductionnelles dans le développement du PTTi. A ce jour, l'existence de facteurs de risque constitutionnels au développement de PTTi reste mal connue. Une rupture de la tolérance immune est à l'origine d'une réponse humorale dirigée contre ADAMTS13. Si les mécanismes à l'origine de cette dysimmunité ne sont pas connus, plusieurs acteurs ont été identifiés. Le PTTi est médié par des auto-anticorps dirigés contre ADAMTS13<sup>121,170</sup>, essentiellement des IgG. Des IgA et des IgM ont également été détectés chez une minorité de patients, en association avec des IgG<sup>171,172</sup>. Des IgG anti-ADAMTS13 ont été mises en évidence chez 75 à 90% des patients atteints de PTT acquis<sup>119,131,163,173-176</sup>. L'étude des sous-classes d'IgG révèle une prédominance des IgG4 (90%), puis d'IgG1 et IgG2 (de l'ordre de 50%) tandis que les IgG3 sont les moins fréquentes (33%)<sup>177,178</sup>. L'influence des isotypes

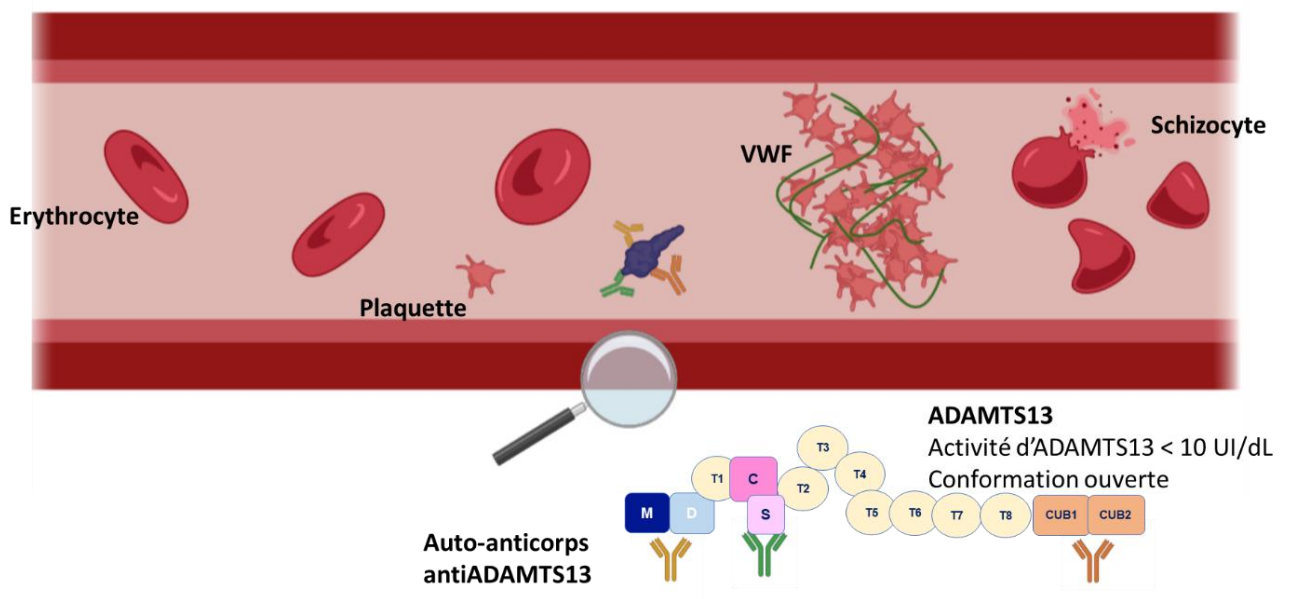


d'immunoglobulines anti-ADAMTS13 ou des sous-classes d'IgG anti-ADAMTS13 sur la présentation clinique reste à clarifier. La présence d'IgG4 anti-ADAMTS13 semble toutefois associée à un risque accru de rechute<sup>177,179</sup>. Depuis les années 2010, des associations avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ont été décrites : l'allèle *HLA-DRB1\*04* est rapporté comme un facteur protecteur contre le développement d'un PTTi tandis que l'allèle *HLA-DRB1\*11* et le variant rs6903608 apparaissent au contraire comme un facteur de prédisposition à la maladie<sup>180–182</sup>. Les allèles *HLA-DRB1\*11* et *HLA-DRB1\*03* codent pour des molécules du CMH de classe II capables de présenter des peptides contenant respectivement le motif FINVAPHAR et le motif ASYLIRD, issus de la dégradation du domaine CUB2 d'ADAMTS13 par les cellules présentatrices d'antigènes, aux lymphocytes T CD4+<sup>183–185</sup>. D'autre part, un répertoire de lymphocytes B mémoires produisant des anticorps anti-ADAMTS13 ainsi qu'un réarrangement de la partie variable des chaînes lourdes d'immunoglobulines V<sub>H</sub>1-69 ont été mis en évidence par plusieurs études portant sur la caractérisation d'auto-anticorps anti-ADAMTS13 issus de plasmas de patients atteints de PTTi<sup>186–188</sup>. Ces auto-anticorps anti-ADAMTS13 sont polyclonaux et peuvent être dirigés contre le domaine riche en cystéines, les domaines CUB1 et 2 et le domaine TSP1-8<sup>189,190</sup>, mais la quasi-totalité des patients présentent des auto-anticorps dirigés contre le domaine *spacer*<sup>68,191–194</sup>, en particulier contre un épitope impliquant les acides aminés R568, F592, R660, Y661 et Y665<sup>195</sup>. C'est un épitope qui est physiologiquement cryptique, masqué par les domaines CUB1 et CUB2 lorsque ADAMTS13 adopte une conformation fermée<sup>97,100</sup>, et qui est exposé physiologiquement lors de l'activation allostérique d'ADAMTS13 par le VWF. Jian et al ont montré l'importance de ces sites en produisant des protéines recombinantes d'ADAMTS13 par mutagenèse dirigée avec des mutations portant sur ces sites et conférant une résistance à l'inhibition par les auto-anticorps anti-ADAMTS13<sup>102</sup>. Plus récemment, trois motifs du domaine *spacer* (aa 588 à 592, aa 602 à 610 et aa 657 à 666) ont été identifiés comme cibles privilégiées des auto-anticorps anti-ADAMTS13<sup>196</sup> (**Figure 10**).



**Figure 10. Rupture de tolérance immunitaire et production d'auto-anticorps anti-ADAMTS13.**

Une étude pivot de Roose et al publiée en 2018 montre qu'à la phase aiguë du PTTi, ADAMTS13 adopte une conformation ouverte<sup>197</sup>, et expose des épitopes cryptiques au niveau de son domaine *spacer* qui sont la principale cible des anticorps anti-ADAMTS13<sup>198</sup>. La conformation d'ADAMTS13 est par ailleurs retrouvée ouverte en cas de rechute biologique, suggérant sa forte implication dans la physiopathologie du PTTi<sup>199</sup> (**Figure 11**). Il a par ailleurs été montré *in vitro* que certains auto-anticorps ont la capacité d'ouvrir ADAMTS13<sup>194</sup>, ce qui pourrait être à l'origine d'une seconde vague d'auto-anticorps ciblant des épitopes cryptiques *in vivo* exposés par l'ouverture d'ADAMTS13. Les anticorps anti-ADAMTS13 peuvent être neutralisants et bloquer alors l'activité protéolytique d'ADAMTS13<sup>121,193,200</sup> ou non neutralisants permettant la formation des complexes immuns circulants (CIC), accélérant la clairance d'ADAMTS13<sup>171,175,193,201</sup>.



**Figure 11. Caractéristiques biologiques du purpura thrombotique thrombocytopénique acquis auto-immun.**

Chez 20% à 25% des patients atteints d'une forme acquise de PTT, il n'est pas mis en évidence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13. Les IgG anti-ADAMTS13 peuvent être complexées à ADAMTS13 au sein de CIC qui ne sont pas détectés par les méthodes chromogéniques actuelles. Une proportion de ces patients est vraisemblablement bien atteinte d'une forme auto-immune de PTT pour laquelle la recherche d'anticorps anti-ADAMTS13 est faussement négative (environ 10% des PTTi)<sup>202</sup>. Le déficit sévère en ADAMTS13 peut être lié à un défaut de synthèse (insuffisance hépatocellulaire voire cirrhose<sup>203,204</sup>), une consommation ou une dégradation d'ADAMTS13 par des enzymes telles que la plasmine, la thrombine ou des interleukines pro-inflammatoires dans des contextes inflammatoires ou septiques<sup>83,205,206</sup>. Ces PTT acquis ont pour particularité d'être souvent associés à des contextes cliniques particuliers<sup>131</sup>. Enfin, une étude récente montre que la conformation d'ADAMTS13 est fermée à la phase aiguë de ces PTT acquis particuliers contrairement au PTTi, soulignant les différences mécanistiques entre ces deux entités<sup>207</sup>. Notre groupe a proposé de nommer ces PTT acquis à IgG

négatives PTTu (pour *unidentified pathophysiology*) afin de clarifier la nomenclature actuelle où l'abréviation PTTa (pour PTT acquis) peut désigner aussi bien l'ensemble des PTT acquis (PTTi et PTTu) qu'uniquement les PTTu selon les publications.

#### 4. Diagnostic biologique

Devant une suspicion de MAT de type PTT, le diagnostic de certitude du PTT repose sur la mesure d'une activité d'ADAMTS13 effondrée. La mesure de l'activité d'ADAMTS13 est un examen de biologie médicale hyperspécialisé réservé à des laboratoires référents, et le résultat n'est le plus souvent pas disponible avant 72 heures. Des scores de probabilité clinico-biologique du PTT ont ainsi été développés par le CNR-MAT<sup>124</sup> (French score) et par une équipe américaine<sup>208</sup> (PLASMIC score) à partir de paramètres simples et rapidement disponibles afin de pouvoir initier le traitement en urgence. La mesure de l'activité d'ADAMTS13 permet alors une confirmation du diagnostic de PTT rétrospective<sup>209</sup>. Récemment, il a été suggéré d'incrémenter ces scores avec la protéinurie pour en augmenter la sensibilité<sup>210,211</sup>. Ces scores de probabilité clinico-biologique prédisent un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 avec une sensibilité satisfaisante sont présentés dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1. Comparaison du French Score et du PLASMIC Score.**

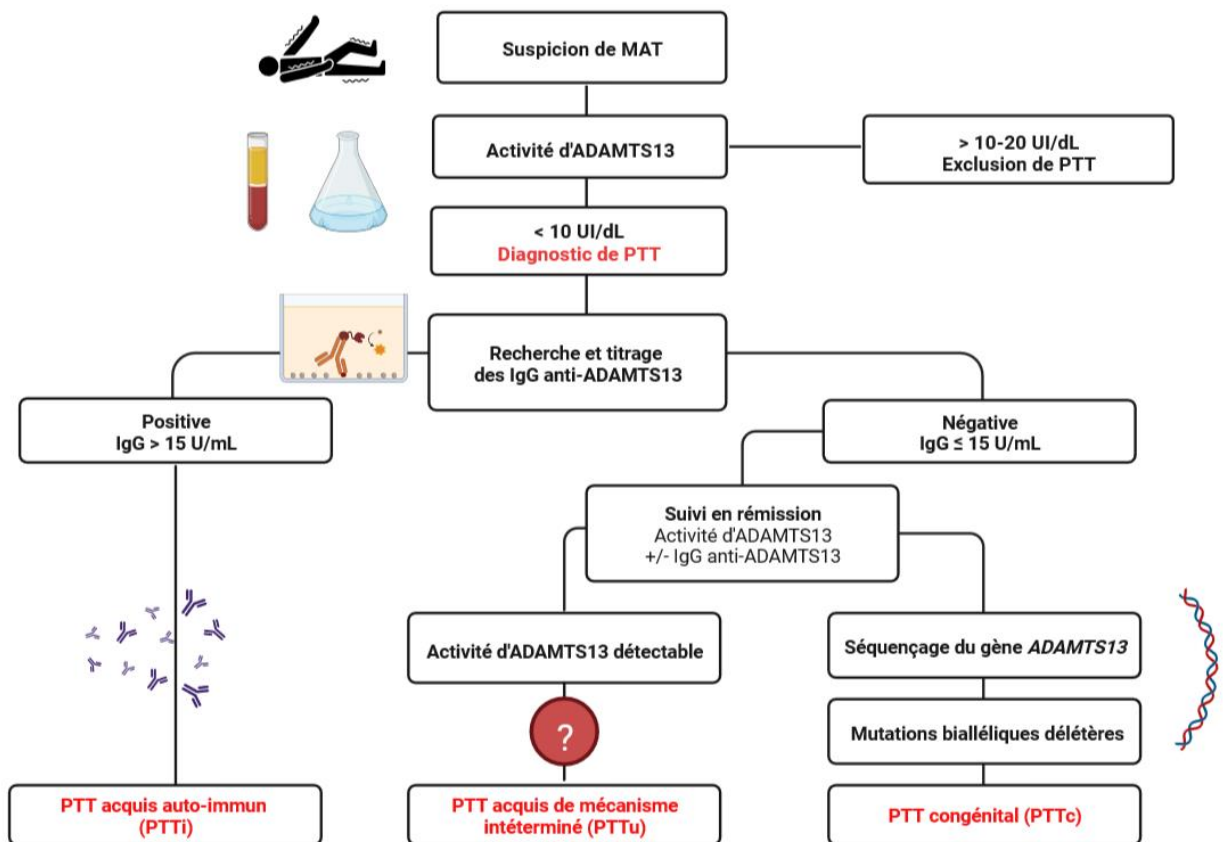
| Paramètres   | French Score                                      | PLASMIC Score  |
|--|---|--|
| <b>Plaquettes</b>  | < 30 G/L (+1)                                     | < 30 G/L (+1)  |
| <b>Créatininémie</b>   | < 2,26 mg/dL (+1)                                 | < 2,0 mg/dL (+1)   |
| <b>Hémolyse :</b><br>- <b>Bilirubine libre &gt; 2 mg/dL</b><br>- <b>OU réticulocytes &gt; 2,5%</b><br>- <b>OU haptoglobine effondrée</b> | *   | +1   |
| Absence de néoplasie dans l'année précédente   | *   | +1   |
| Absence de greffe d'organe ou de CSH   | *   | +1   |
| INR < 1,5  | *   | +1   |
| VGM < 90 fL  | N/A   | +1   |
| <b>Probabilité d'un déficit en ADAMTS13 &lt; 10 UI/dL</b>  | <b>0 : 2%</b><br><b>1 : 70%</b><br><b>2 : 94%</b> | <b>0-4 : 0-4%</b><br><b>5 : 5-24%</b><br><b>6-7 : 62-84%</b> |

N/A : non applicable

\* Le French score est applicable aux patients présentant ces critères.

La mesure de l'activité d'ADAMTS13 est l'examen de référence pour confirmer ou infirmer un diagnostic de PTT. Le principe général de toutes les méthodes est similaire et repose sur la détection et la quantification des produits de dégradation d'un substrat exogène (VWF *full length*, entier, ou VWF73, peptide minimal nécessaire à la reconnaissance et au clivage par ADAMTS13) par l'ADAMTS13 présente dans le plasma du patient<sup>212-214</sup>. Les méthodes historiques utilisent des modes de détection basés sur l'électrophorèse sur gel d'agarose SDS-PAGE et l'immunoblot ou le western-blot<sup>170,215</sup>, la

capacité de liaison au collagène<sup>216</sup>, l'activité cofacteur de la ristocétine du VWF<sup>217</sup> ou l'immunoradiomarquage<sup>218</sup>. Ces méthodes nécessitent une expertise technique considérable et ne peuvent pas être utilisées dans le cadre soins. En 2005, Kokame et al<sup>219</sup> a publié une méthode de mesure de l'activité d'ADAMTS13 dont le principe de détection repose sur une émission de fluorescence : le FRET-VWF73 (*fluorescence-resonance energy transfer*). Aujourd'hui, le FRET-VWF73 est la méthode de référence internationale<sup>209,220</sup>. D'autres méthodes de détection ont été développées depuis les années 2010 : chromogénie (ELISA<sup>221</sup>), spectrométrie de masse<sup>222</sup> et plus récemment chimiluminescence<sup>223</sup>. La méthode chromogénique et la méthode automatisée chimiluminescente sont utilisées par certains laboratoires grâce à leur facilité d'emploi (trousses commerciales), mais leurs performances diagnostiques sont moins satisfaisantes que le FRET-VWF73<sup>220</sup>. En pratique courante, l'examen de première intention est la mesure de l'activité d'ADAMTS13. Une activité détectable (>10-20 UI/dL) permet d'exclure le diagnostic de PTT. Si l'activité d'ADAMTS13 est effondrée (< 10 UI/dL), la recherche et le titrage des anticorps anti-ADAMTS13 sont effectués pour préciser le mécanisme du déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13. Enfin, si l'activité d'ADAMTS13 reste indétectable en rémission et que la recherche des auto-anticorps anti-ADAMTS13 n'est jamais positive, un séquençage du gène *ADAMTS13* doit être réalisé avec le consentement du patient ou des parents de l'enfant pour étayer l'hypothèse d'un PTTc. La stratégie d'investigation biologique d'ADAMTS13 est présentée dans la **Figure 12**.



**Figure 12. Stratégie d'exploration biologique d'une suspicion clinique de purpura thrombotique thrombocytopenique**

## 5. Prise en charge thérapeutique

### a) Historique

Le pronostic du PTT est longtemps resté extrêmement sombre (mortalité >90%), et l'utilisation empirique d'une plasmathérapie et de glucocorticoïdes a été évoquée comme piste thérapeutique dès la fin des années 1970<sup>112,113,224</sup>. En 1991, l'hématologue canadienne Gail Rock a publié une étude qui a révolutionné la prise en charge du PTT en montrant que les échanges plasmatiques (EP) au plasma frais congelé (PFC) permettent d'obtenir une rémission clinique chez certains patients<sup>225</sup>. La probabilité de survie s'éleva alors à 80-90%, mais s'accompagnait d'un risque de rechute élevé, auparavant masqué par les décès fréquents des patients<sup>226,227</sup>. La splénectomie, qui demeure aujourd'hui une option thérapeutique envisagée en dernier recours dans le PTTi, a également été proposée<sup>228</sup>. La mise en évidence du rôle fondamental des auto-anticorps anti-ADAMTS13 a conduit dans les années 2000 à utiliser un anticorps monoclonal dirigé contre le CD20, le rituximab, pour dépléter les lymphocytes B et agir sur la production plasmocytaire de ces anticorps dirigés contre ADAMTS13<sup>229-232</sup>. La N-acétylcystéine (NAC) est un dérivé de la cystéine possédant des propriétés mucolytiques et notamment capable de réduire les ponts disulfures du VWF et donc de prévenir sa liaison aux plaquettes. La NAC a également montré *in vitro* sa capacité de réduire la taille des multimères du VWF<sup>233</sup>. L'utilisation chez l'animal<sup>234</sup> ou chez l'homme<sup>235-237</sup> de la NAC comme thérapie adjuvante lors de la phase aiguë du PTT a donné des résultats divergents et sa place dans l'arsenal thérapeutique actuel est floue. Enfin, un nouvel axe thérapeutique a été ouvert en 2016 par le développement d'un nanocorps bivalent humanisé dirigé contre le domaine A1 du VWF, le caplacizumab (ALX-0081). Il empêche l'interaction du VWF avec la GPIIb $\alpha$  et prévient la formation de microthrombi<sup>238,239</sup>. Les critères d'évaluation de la réponse au traitement et du suivi ont été actualisés<sup>130,240</sup> et sont présentés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2. Critères d'évaluation de la réponse au traitement à la phase aiguë et au cours du suivi du purpura thrombotique thrombocytopénique (d'après Cuker et al., *Blood*, 2021).**

|                             | Définition  | Implications  |
|-----------------------------|---|---|
| <b>Réponse clinique</b>     | Plaquettes > 150 G/L et LDH < 1,5 N et absence de nouvelle atteinte d'organe  | Permet l'arrêt des EP +/- retour à domicile   |
| <b>Exacerbation</b>         | Diminution des plaquettes < 150 G/L après la réponse clinique et avant la rémission clinique dans les 30 jours suivant l'arrêt des EP ou caplacizumab | Risque plus important tant que l'activité d'ADAMTS13 reste indétectable<br>Risque moins important lors d'un traitement par caplacizumab |
| <b>PTT réfractaire</b>      | Persistance d'une thrombopénie < 50 G/L et LDH > 1,5 N après un traitement comprenant cinq EP et des glucocorticoïdes                                 | Intensification du traitement   |
| <b>Rémission biologique</b> | Activité d'ADAMTS13 >20 UI/dL   | Toujours accompagnée d'une rémission clinique   |
| <b>Rémission clinique</b>   | Réponse clinique > 30 jours   | Pas toujours accompagnée d'une rémission biologique   |
| <b>Rechute biologique</b>   | Diminution de l'activité d'ADAMTS13 < 20 UI/dL  | Indication à un traitement pré-emptif par rituximab   |
| <b>Rechute clinique</b>     | Activité d'ADAMTS13 effondrée et plaquettes < 150 G/L +/- autres signes clinico-biologiques (anémie hémolytique, atteinte d'organe)                   | Traitement curatif  |

### b) Cibles thérapeutiques en 2022

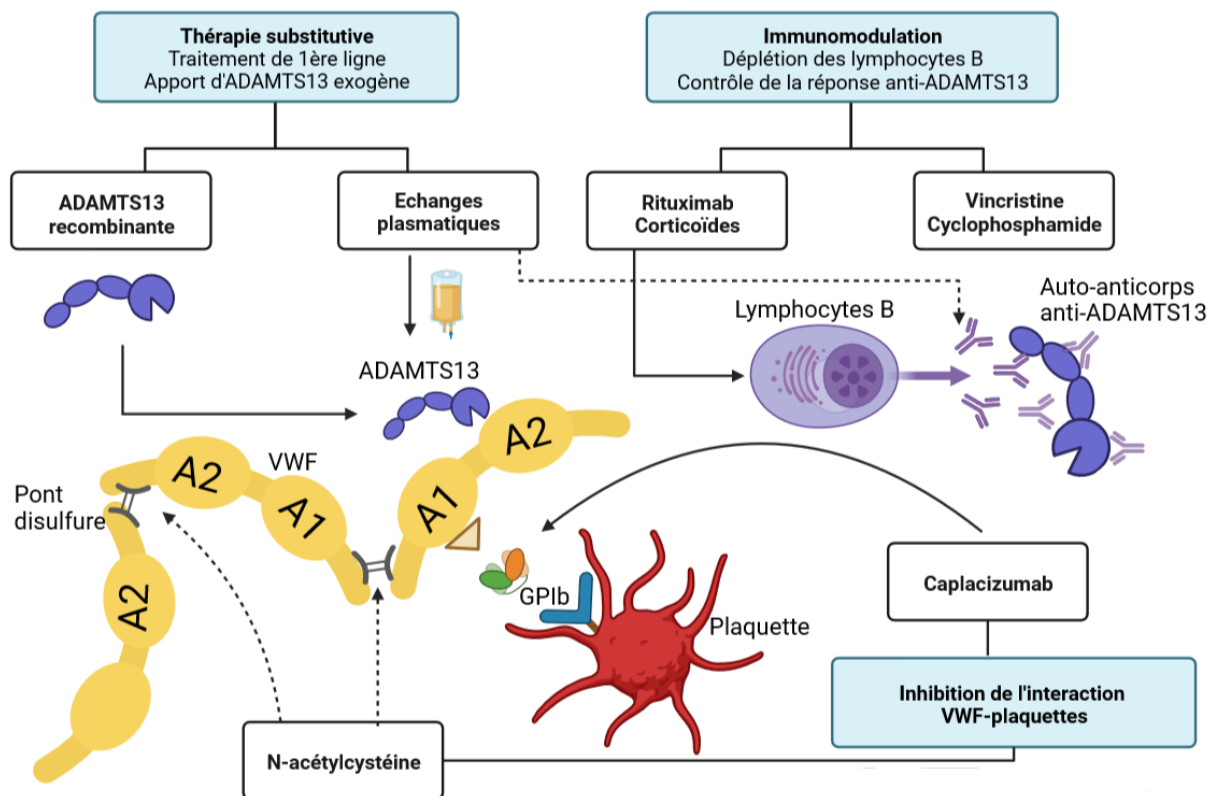
La prise en charge d'un PTT à la phase aiguë nécessite une hospitalisation en unité de soins intensifs en urgence. Le premier axe thérapeutique repose sur les EP au PFC, à la posologie de 40 à 60 mL/kg, quotidiennement jusqu'à la rémission clinique (voir Tableau 1.) Cette stratégie est indiquée dans la forme congénitale comme dans la forme acquise de PTT<sup>225,241</sup>. Elle permet d'une part d'apporter de l'ADAMTS13 exogène et de restaurer la balance VWF/ADAMTS13, et d'autre part d'épurer physiquement des auto-anticorps anti-ADAMTS13 dans le PTTi. Il est recommandé d'espacer progressivement les EP pour prévenir le risque d'exacerbation. En cas d'impossibilité de poser un cathéter central ou de disposer d'un équipement permettant des EP, la perfusion de PFC est une alternative envisageable.

Le deuxième axe thérapeutique est l'immunomodulation avec pour objectif la déplétion B et l'éradication des auto-anticorps anti-ADAMTS13. Les recommandations actuelles préconisent des glucocorticoïdes à la dose de charge de 1-1,5 mg/kg/j, avec une décroissance progressive sur 2 à 3 mois, et l'utilisation de rituximab, avec un protocole d'une dose de 375 mg/m<sup>2</sup>/semaine sur 4 semaines. Cette stratégie n'est recommandée que dans le PTTi et implique d'avoir éliminé toute contre-indication (en particulier une immunodépression profonde, une infection par le VHB, le VHC ou le VIH<sup>232</sup>). L'utilisation du rituximab dès la phase aiguë du PTTi augmente la probabilité d'atteindre la rémission clinique et diminue le risque

de rechute à un an<sup>242</sup>, avec un profil de tolérance tout à fait satisfaisant<sup>243</sup>. Cependant, son délai d'action est long (environ 10-14 jours). D'autres immunosuppresseurs peuvent être utilisés en deuxième intention, en cas d'échec ou d'intolérance au rituximab tels que le cyclophosphamide<sup>244</sup>, la ciclosporine<sup>245</sup>, d'autres anticorps monoclonaux anti-CD20 avec l'obinutuzumab et l'ofatumumab<sup>246</sup> notamment ou d'anticorps monoclonaux anti-CD38 tel le daratumumab<sup>247</sup>. L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome tel le bortezomib est également rapporté dans les cas de PTT réfractaires<sup>248,249</sup>.

Enfin, le troisième axe thérapeutique repose sur l'inhibition de l'interaction entre le VWF et les plaquettes. Le caplacizumab a montré lors d'essais cliniques multicentriques internationaux de phase II (TITAN<sup>250,251</sup>) et de phase III (HERCULES<sup>251,252</sup>) que son utilisation conjointe aux EP et à l'immunomodulation permet de diminuer le délai de normalisation plaquettaire et la probabilité d'une exacerbation. Désormais il fait partie intégrante du traitement de première intention dans le PTT acquis en France, en association avec les EP, le traitement immunomodulateur (glucocorticoïdes et rituximab) mais la question du coût de ce médicament innovant reste problématique<sup>253</sup>. Son utilisation en pédiatrie et en contexte obstétrical reste à évaluer. La **Figure 13** reprend ces trois axes thérapeutiques qui constituent l'arsenal thérapeutique de première intention en 2022.

Deux thérapies innovantes sont actuellement en cours d'étude. Une ADAMTS13 humaine recombinante (rhADAMTS13, BAX930) a fait l'objet d'évaluations satisfaisantes (pharmacocinétique, capacité de clivage des multimères du VWF) dans des modèles animaux étudiés lors d'études précliniques<sup>254-256</sup> ainsi que dans une étude pharmacocinétique chez l'humain<sup>257</sup>. Un essai clinique de phase III en tant que thérapie prophylactique et en tant que thérapie curative chez des patients atteints de PTTc a récemment été conclu (NCT03393975) et un essai de continuation est en cours. Un essai clinique de phase IIb évaluant cette rhADAMTS13 à la phase aiguë du PTTi doit commencer prochainement (NCT03922308). Enfin, une équipe néerlandaise a très récemment développé un variant d'ADAMTS13 recombinant résistant aux auto-anticorps anti-ADAMTS13 dirigés contre le domaine *spacer* et qui conserve sa capacité à cliver le VWF<sup>258,259</sup>. Cette thérapeutique prometteuse dans le PTTi reste à être évaluée dans des études précliniques.



**Figure 13. Cibles thérapeutiques du purpura thrombotique thrombocytopénique en 2022**

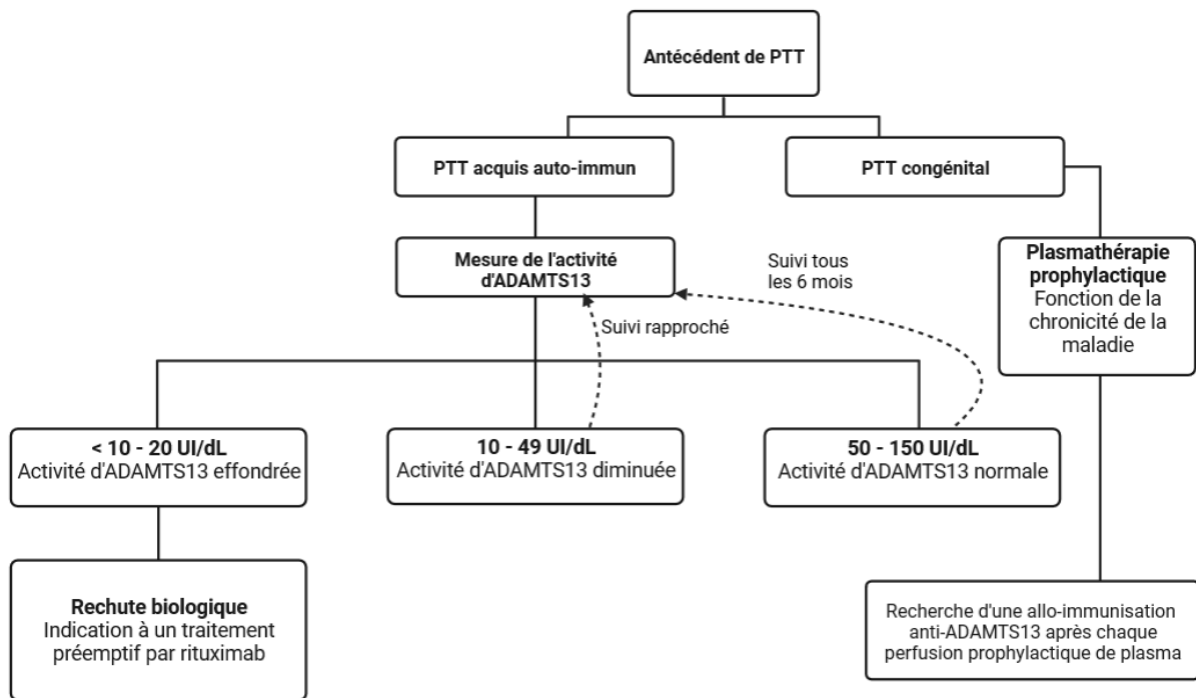
## 6. Suivi

En rémission clinique, tous les patients atteints de PTT bénéficient d'un suivi tout au long de leur vie pour prévenir les rechutes, en particulier dans certaines situations cliniques pouvant déclencher un nouvel épisode de PTT (grossesse, infection, prise de certains médicaments, chirurgie...<sup>241</sup>). Dans le PTT acquis, le risque de rechute est estimé à 40%<sup>260</sup>. Le suivi biologique repose notamment sur une mesure régulière de l'activité d'ADAMTS13 et une surveillance de l'hémogramme (taux d'hémoglobine et numération plaquettaire) afin de détecter une éventuelle rechute biologique ou clinique. Une diminution voire un effondrement de l'activité d'ADAMTS13 (<10 UI/dL) constitue en effet un biomarqueur prédictif de rechute très sensible<sup>261,262</sup>. Une activité d'ADAMTS13 <10 IU/dL peut constituer une indication à un traitement préemptif par rituximab, permettant d'éviter une rechute clinique par une déplétion des lymphocytes B et une éradication des auto-anticorps anti-ADAMTS13<sup>263</sup>. La survenue d'une autre maladie auto-immune en rémission (lupus notamment) est bien documentée chez les patients atteints de PTTi et implique une surveillance clinique et biologique adaptée<sup>264,265</sup>. Plus récemment, des macro-thromboses neurologiques ou cardiaques ont été rapportées comme cause majeure de morbi-mortalité chez les patients atteints de PTTi, en particulier lors d'un déficit partiel en ADAMTS13<sup>266-268</sup>. La question de normaliser l'activité d'ADAMTS13 au-dessus de 70 UI/dL chez ces patients est ouverte. Enfin, des séquelles neurocognitives et psychologiques importantes peuvent marquer la vie de ces patients et nécessiter une prise en charge adaptée<sup>269,270</sup>. Enfin, pour les patientes en âge de procréer, la problématique d'un projet parental est délicate et nécessite idéalement une



normalisation préalable de l'activité d'ADAMTS13 ainsi qu'un suivi mensuel de l'activité d'ADAMTS13<sup>160</sup>. Le suivi des patients atteints de PTTc diffère puisqu'il est le plus souvent nécessaire de leur administrer du PFC en prophylaxie pour les maintenir en rémission. La fréquence d'administration du PFC est guidée par la chronicité de la maladie (toutes les semaines à toutes les trois semaines), et certains patients peuvent être simplement surveillés sans PFC<sup>253,271,272</sup>. Dans le cas d'une nouvelle grossesse, le risque de rechute de PTTc est majeur et des perfusions prophylactiques de plasma permettent le plus souvent de mener une grossesse à terme<sup>160</sup>.

La **Figure 14** résume le suivi clinico-biologique proposé aux patients atteints de PTT.



**Figure 14. Suivi des patients atteints de purpura thrombotique thrombocytopénique**

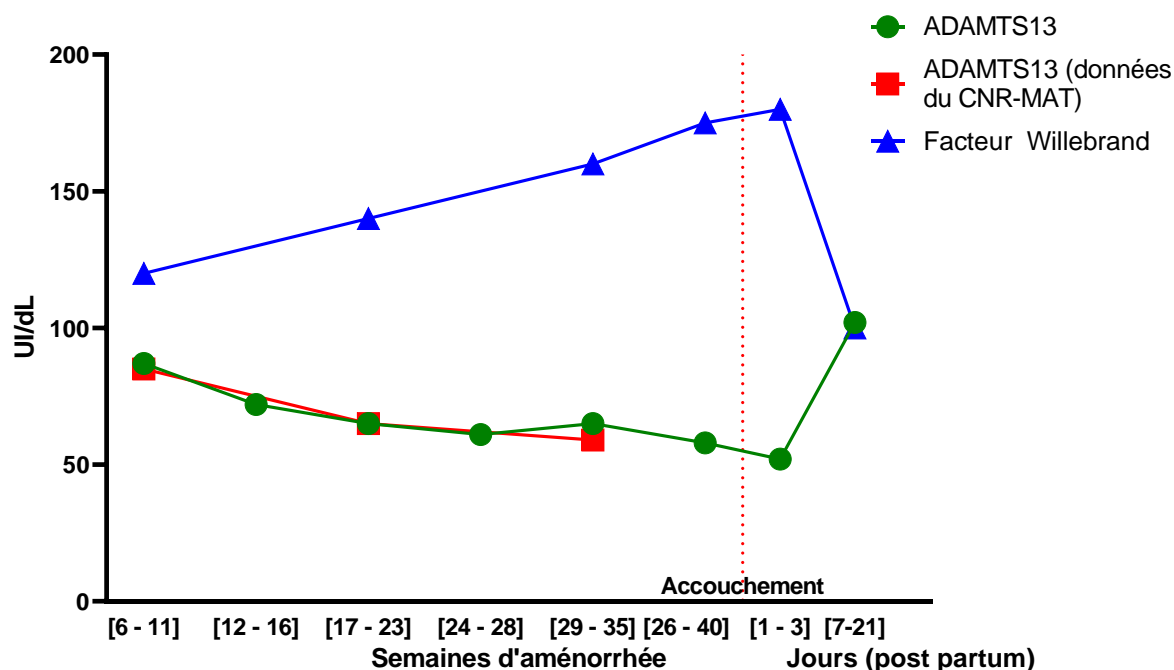
### III. Le purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical

La grossesse est associée à des adaptations physiologiques de l'hémostase et du système immunitaire. Dans les cohortes décrites dans la littérature internationale, la grossesse est un facteur de risque de développer un PTT (10% des PTT surviennent au cours d'une grossesse). Ces études montrent également une fréquence particulièrement élevée de la forme congénitale dans les PTT obstétricaux<sup>123,131,138,273</sup>.

#### 1. Modifications de l'hémostase au cours de la grossesse

Une diminution modérée et physiologique de la numération plaquettaire, communément appelée thrombopénie gestationnelle, est observée dans 5 à 10% des grossesses. Elle est le plus souvent une

conséquence de la modification du volume de distribution liées à la grossesse (hémodilution). Cette thrombopénie gestationnelle survient généralement au 2<sup>ème</sup> trimestre et peut persister jusqu'à 3 mois en post-partum. La thrombopénie gestationnelle correspond à 75% des thrombopénies observées au cours de la grossesse et n'entraîne aucune complication materno-foetale<sup>274</sup>. Parallèlement, des modifications physiologiques touchent également les protéines de l'hémostase. Le VWF et le FVIII augmentent dès le début de la grossesse et peuvent atteindre des taux supérieurs à 200 UI/dL en VWF:Ag, en activité cofacteur de la ristocétine du VWF (VWF:RCo) et en activité coagulante du FVIII (FVIII:C), avec un retour aux valeurs physiologiques une à trois semaines en post-partum. Cette augmentation du VWF au cours de la grossesse entraîne une diminution modérée de l'activité d'ADAMTS13 de 20 à 40% par rapport aux valeurs avant la grossesse<sup>86,275</sup> (**Figure 15**). Les facteurs II, V et IX restent relativement stables tandis que les facteurs VII, X et le fibrinogène augmentent au cours de la grossesse et que le facteur XI diminue. Parmi les inhibiteurs physiologiques de la coagulation, l'antithrombine diminue de l'ordre de 15 à 20%, la protéine S diminue jusqu'à 50% à terme au contraire de la protéine C qui augmente au 2<sup>ème</sup> trimestre de l'ordre de 20%<sup>276-279</sup>. Enfin, une diminution de l'activateur tissulaire du plasminogène et de l'alpha-2-antiplasmine, parallèlement à l'augmentation du plasminogène et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène entraînent une hypofibrinolyse physiologique<sup>275</sup>. Les D-dimères augmentent progressivement au cours de la grossesse<sup>280</sup>. Ces modifications entraînent au global un phénotype pro-thrombotique pouvant perdurer jusqu'à six semaines en post-partum.



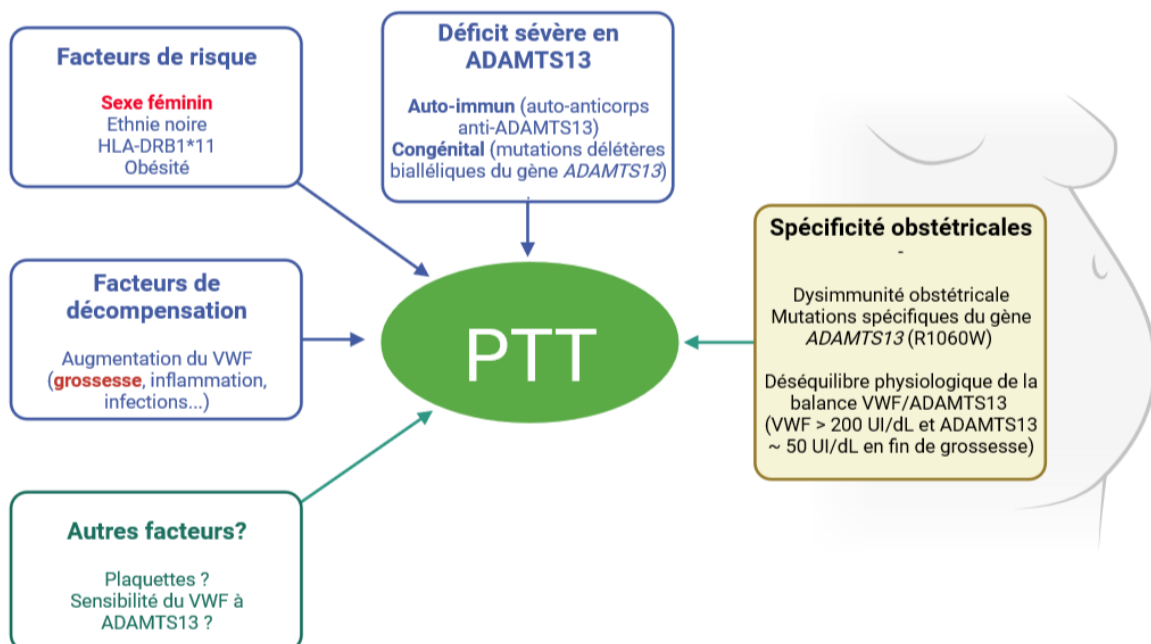
**Figure 15. Evolution des taux de facteur Willebrand et d'ADAMTS13 au cours de la grossesse et en post-partum.**

## 2. Rupture de tolérance immune en contexte obstétrical

Les maladies auto-immunes touchent principalement les femmes en âge de procréer. Bien que l'auto-immunité soit multifactorielle, ces données démographiques suggèrent un rôle des hormones sexuelles dans l'émergence de ces pathologies<sup>281</sup>. La grossesse est également associée aux maladies auto-immunes et peut déclencher soit leur apparition soit l'exacerbation d'une pathologie auto-immune pré-existante<sup>282,283</sup>. La grossesse entraîne physiologiquement des modifications profondes et transitoires du système immunitaire afin de permettre le développement d'une entité semi-allogénique, le fœtus<sup>284,285</sup>. Lors de l'implantation, la balance entre une réponse cellulaire Th1/Th17 pro-inflammatoire et une réponse humorale Th2/Treg est modifiée en faveur d'une réponse majoritairement Th2/Treg favorisant la tolérance immune à l'interface materno-fœtale<sup>286</sup>. D'autre part, les cytotrophoblastes produisent des cytokines anti-inflammatoires (notamment l'interleukine 10) qui participe à la tolérance immunitaire vis-à-vis des antigènes allogéniques du fœtus<sup>287</sup>. De façon intéressante, des taux élevés d'interleukine 10 ont déjà été rapportés à la phase aiguë du PTT acquis indépendamment du contexte obstétrical<sup>288</sup>. Enfin, les modifications hormonales associées à la grossesse (augmentation du cortisol, de l'estriol, de la progestérone notamment) pourraient en partie expliquer la rupture de tolérance immune associée à l'émergence d'une auto-immunité<sup>282,289</sup>.

## 3. Purpura thrombotique thrombocytopénique de révélation obstétricale

Le contexte obstétrical se situe donc à la croisée des chemins entre les facteurs de risque et les facteurs précipitants pouvant favoriser l'émergence d'un PTT (**Figure 16**).



**Figure 16. Facteurs de risque et facteurs précipitants associés au purpura thrombotique thrombocytopénique de révélation obstétricale.**

### a) Purpura thrombotique thrombocytopénique congénital de révélation obstétricale

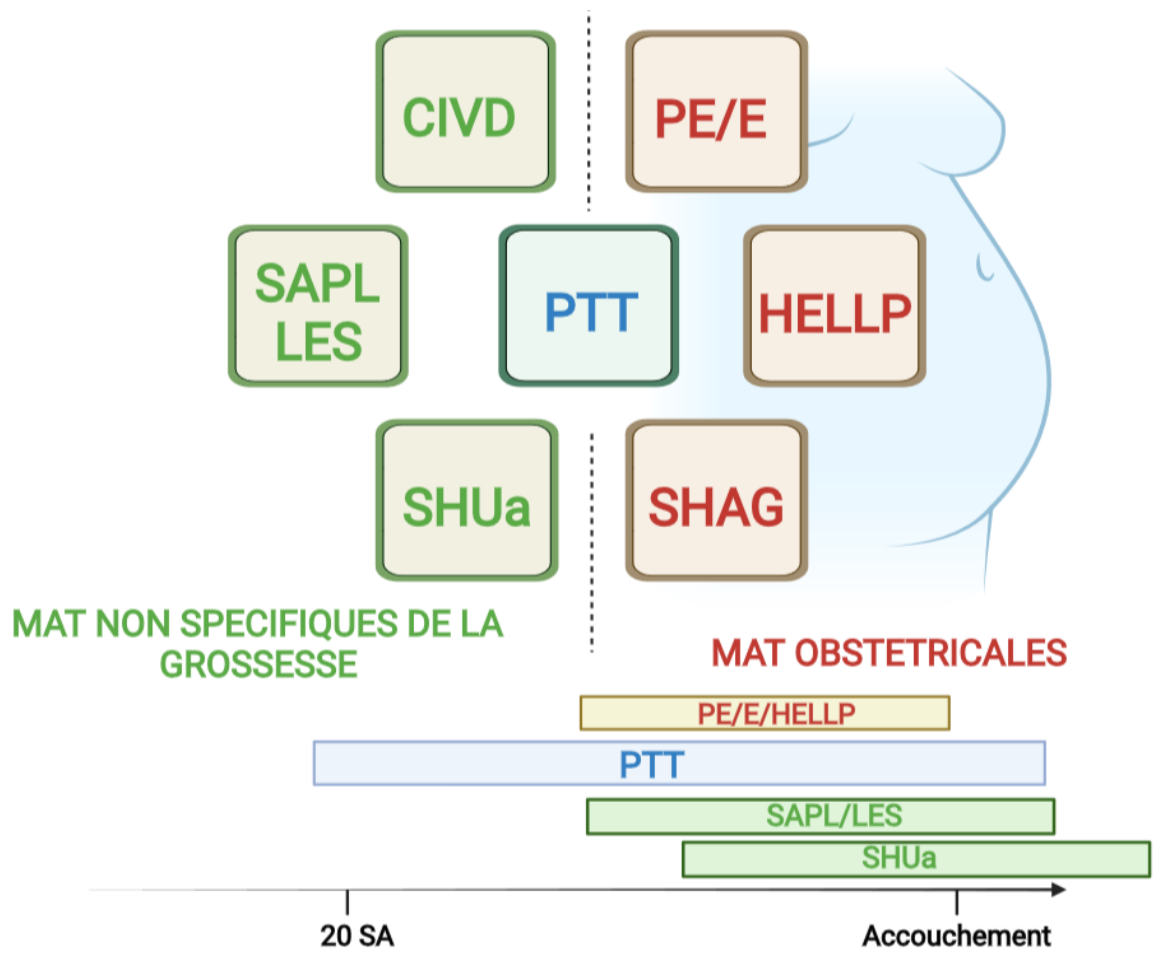
La première publication rapportant très probablement un PTTc de révélation obstétricale date de 1976. Fuchs et al décrivent l'histoire de deux sœurs ayant développé un premier épisode de PTT au 3<sup>ème</sup> trimestre de leurs grossesses respectives, à deux ans d'écart<sup>290</sup>. Après la découverte du gène *ADAMTS13* et de son implication dans le PTTc, la première association entre un PTTc révélé à l'âge adulte et en contexte obstétrical a été publiée en 2009 par l'équipe de l'Université de Nara au Japon<sup>273</sup>. D'autres cohortes nationales (France<sup>138</sup>, Royaume-Uni<sup>155</sup>, Norvège<sup>152</sup> notamment) ou internationales<sup>146</sup> ont confirmé cette association forte. Selon les cohortes, la proportion de forme congénitale parmi les PTT obstétricaux varie de 24% (cohorte française publiée en 2012<sup>131,138</sup>) à 66% (cohorte britannique publiée en 2014<sup>155</sup>). Cette proportion augmente en considérant les patientes nullipares. Classiquement, les patientes atteintes de PTTc de révélation à l'âge adulte n'ont pas d'antécédent personnel de poussée de PTT dans la petite enfance. Le PTTc étant une maladie constitutionnelle de transmission autosomique récessive, les patientes n'ont pas d'antécédent familial de syndrome de MAT la plupart du temps. La consanguinité est toutefois un facteur de risque, comme en attestent certaines publications : Miodownik *et al* rapportent les cas de 13 patientes d'origine bédouine toute apparentées et présentant le même génotype d'*ADAMTS13*<sup>291</sup>. La présentation clinique du PTTc de révélation obstétricale diffère peu par rapport à la forme acquise, et le diagnostic différentiel entre ces deux formes nécessite une analyse moléculaire du gène *ADAMTS13*. La poussée de PTTc a généralement lieu dans la seconde moitié de la grossesse voire dans le post-partum, mais de rares cas de fausses couches spontanées précoces ont été décrits dans les cohortes rapportées. Classiquement, la mortalité fœtale, dépassant 50% dans les cohortes « historiques » est attribuée à la présence de multiples thrombi placentaires. Le traitement prophylactique par plasmathérapie normalise l'histologie placentaire et augmente considérablement le pronostic materno-foetal grâce à un apport exogène en *ADAMTS13*.<sup>161,291</sup> Les mutations génétiques responsables du PTTc de révélation adulte sont différentes de celles retrouvées dans la cohorte pédiatrique de PTTc<sup>137</sup>. Dans les études réalisées dans des populations caucasiennes, la mutation R1060W localisée dans le domaine TSP1-7 (exon 24 du gène *ADAMTS13*) est de loin la plus fréquente (jusqu'à 75% des patientes), tandis qu'elle n'est pas ou peu retrouvée dans les cohortes d'origine asiatique ou moyenne-orientale<sup>145,156</sup>. Il existe probablement un nombre équivalent d'hommes dont le génotype d'*ADAMTS13* est similaire : toutefois, le diagnostic de PTTc chez l'homme est exceptionnel à l'âge adulte. La grossesse apparaît donc comme un facteur déclenchant nécessaire et suffisant pour la survenue d'un PTT. L'augmentation précoce et soutenue dans le temps des taux de VWF au cours de la grossesse pourrait jouer un rôle important dans le déséquilibre de l'axe *ADAMTS13/VWF* provoquant une poussée de PTT dans ce contexte<sup>292</sup>. Il a récemment été décrit que la synthèse placentaire d'*ADAMTS13* par les trophoblastes est maximale au cours du premier trimestre. *ADAMTS13* serait un des acteurs nécessaires à la migration et à l'invasion trophoblastique permettant le remodelage des artères spiralées et *in fine* la perfusion placentaire<sup>80</sup>. L'activité d'*ADAMTS13* diminuée voire effondrée inhérente au PTTc pourrait donc participer à un développement anormal de l'arbre vasculaire placentaire et à un défaut de perfusion placentaire, responsables de la morbi-mortalité fœtale caractéristique de cette pathologie<sup>293</sup>.

## **b) Purpura thrombotique thrombocytopénique acquis de révélation obstétricale**

La fréquence de la forme acquise de PTT obstétrical varie selon les études de 34% (cohorte britannique publiée en 2014<sup>155</sup>) à 76% (cohorte française publiée en 2012<sup>131,138</sup>). Une particularité du PTT acquis de révélation obstétricale est qu'il peut survenir du premier trimestre de la grossesse jusqu'au post-partum. Scully et al. postulent dans leur publication de la cohorte britannique que le PTT semble être la seule MAT survenant au premier trimestre de la grossesse<sup>155</sup>. La complexité du diagnostic différentiel de PTT par rapport aux autres MAT d'une part, et de PTTi par rapport au PTTc d'autre part, est un déterminant important dans l'instauration rapide d'une prise en charge adaptée. Le diagnostic de certitude repose, comme dans le PTTi idiopathique, sur la mesure d'une activité d'ADAMTS13 effondrée associée à la présence d'anticorps anti-ADAMTS13 de titre significatif. Le contexte obstétrical est une situation clinique où ces examens biologiques, permettant habituellement un diagnostic rétrospectif après initiation de la plasmathérapie et du traitement immunosuppresseur, peuvent conditionner la prise en charge et sont donc urgents. Le tableau clinique et biologique est sensiblement similaire à ce qui est observé dans le PTTi idiopathique, avec notamment une atteinte neurologique (céphalées, flou visuel voire accident vasculaire cérébral) mais peut également inclure des facteurs confondants associés à la grossesse, notamment une hypertension artérielle<sup>294</sup>. La physiopathologie est également superposable, avec une rupture de tolérance immune et la présence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13 entraînant un déficit fonctionnel sévère d'ADAMTS13. Toutefois, contrairement à d'autres pathologies auto-immunes comme le purpura thrombopénique immunologique<sup>295</sup>, le passage transplacentaire d'IgG anti-ADAMTS13 ou par le lait maternel de la mère à l'enfant ne sont pas démontrés. Aucun cas de PTTi néonatal d'un enfant né d'une mère atteinte de PTTi au cours de sa grossesse n'a été rapporté à ce jour. La morbimortalité fœtale est superposable à ce qui est observé dans la forme congénitale, et semble liée au degré d'atteinte placentaire et au terme de la grossesse. Durant la première moitié de la grossesse, le PTTi peut entraîner une fausse couche spontanée ou une MFIU, tandis que le pronostic fœtal est meilleur dans la seconde moitié de la grossesse<sup>292</sup>.

## **4. Diagnostic différentiel du purpura thrombotique thrombocytopénique avec les autres microangiopathies thrombotiques de la grossesse**

Une difficulté majeure du diagnostic de PTT en contexte obstétrical est liée au diagnostic différentiel vis-à-vis des autres MAT de la grossesse<sup>296</sup> (**Figure 17**). Les scores de probabilité clinico-biologique (French Score et PLASMIC Score) n'ont pas été validés dans le contexte obstétrical.



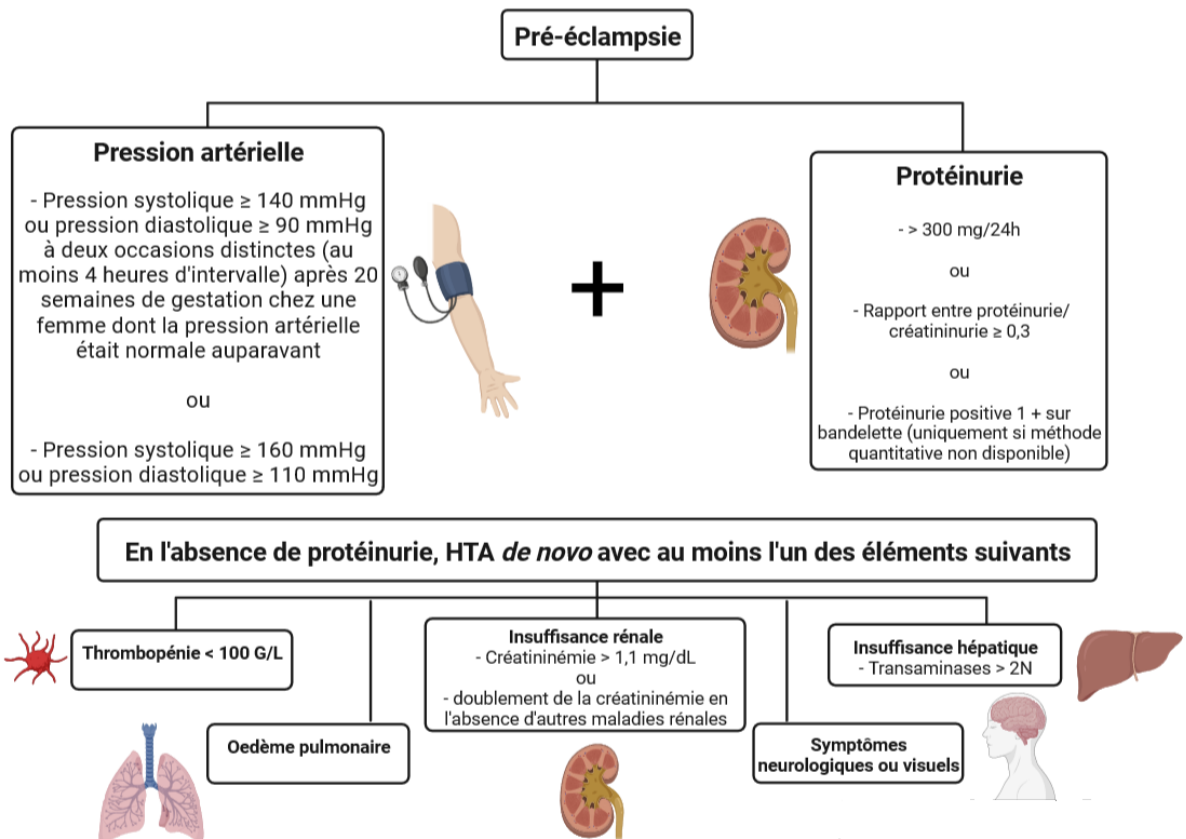
**Figure 17. Purpura thrombotique thrombocytopénique et autres microangiopathies thrombotiques de la grossesse : un diagnostic différentiel difficile.**

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée ; HELLP : *hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets* ; LES : lupus érythémateux systémique ; MAT : microangiopathie thrombotique ; PE/E : pré-éclampsie/éclampsie ; PTT : purpura thrombotique thrombocytopénique ; SAPL : syndrome des antiphospholipides ; SHAG : stéatose hépatique aiguë gravidique ; SHUa : syndrome hémolytique et urémique atypique

#### a) Pré-éclampsie, éclampsie et HELLP syndrome

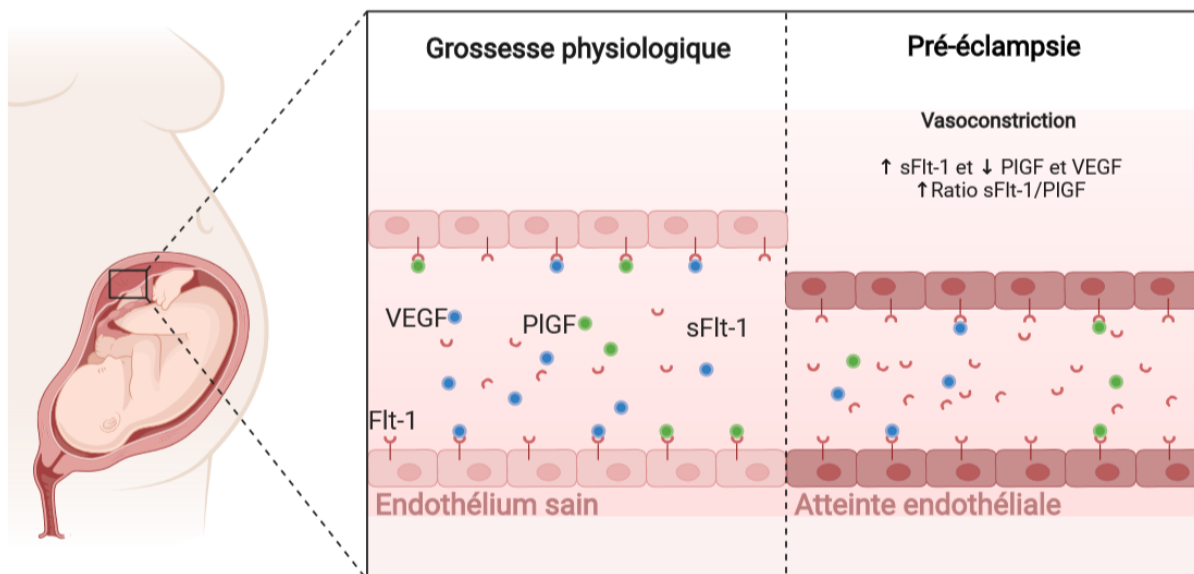
La MAT obstétricale la plus fréquente<sup>297</sup> est une entité physiopathologique correspondant à la gradation qui inclut la pré-éclampsie, l'éclampsie et le HELLP syndrome (*hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets*) selon la sévérité et la présentation clinique. A l'échelle mondiale, cette entité pathologique vasculo-placentaire est responsable du décès de 76 000 femmes et 500 000 enfants chaque année<sup>298</sup>. C'est également un facteur majeur de prématurité, de RCIU voire de MFIU<sup>299-302</sup>.

La pré-éclampsie a récemment été redéfinie<sup>301,303,304</sup> et les critères diagnostiques sont présentés dans la **Figure 18**.



**Figure 18. Critères diagnostiques de la pré-éclampsie.**

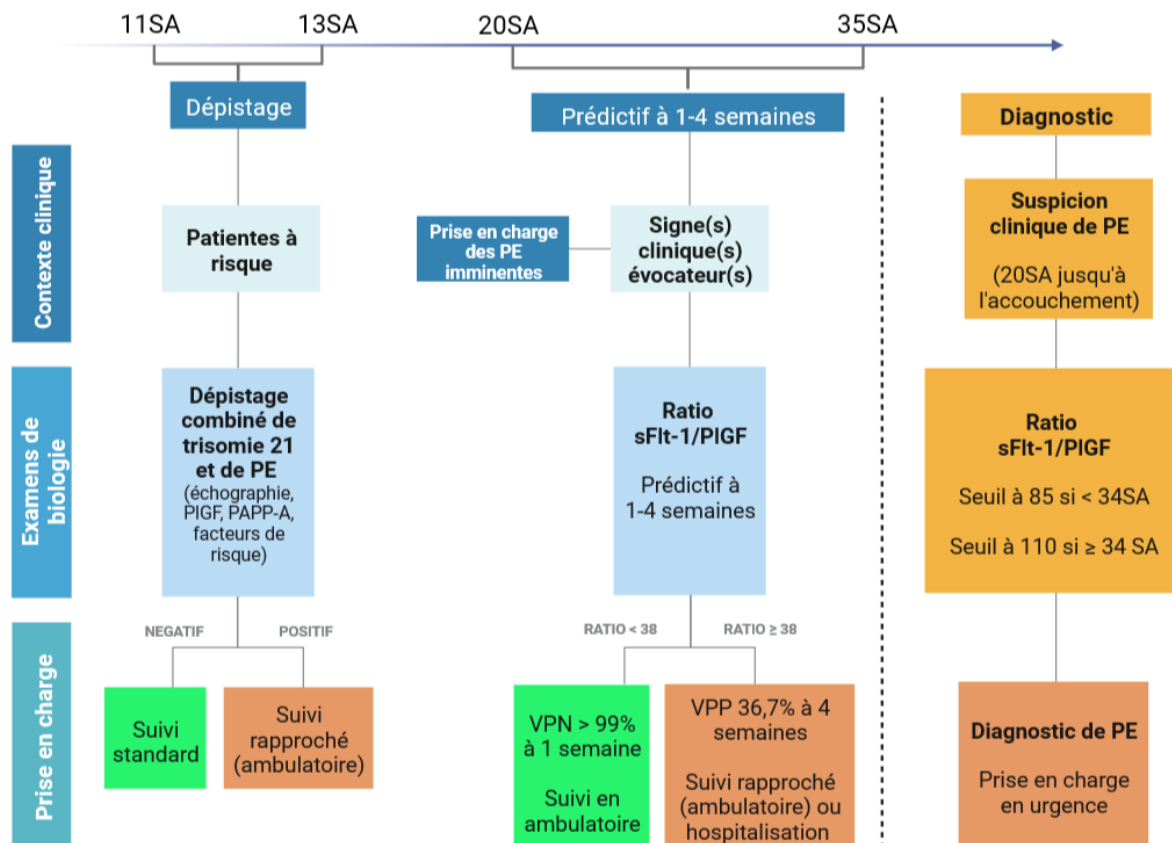
La pré-éclampsie correspond à un défaut de placentation entraînant un remodelage anormal des artères spiralées maternelles et une hypoperfusion placentaire<sup>304,305</sup>. L'hypoxie des trophoblastes villosus entraîne un déséquilibre entre les signalisations pro- et anti-angiogéniques et une dysfonction endothéliale, notamment avec une élévation de sFlt-1 (*soluble fmd-like tyrosine kinase 1*; facteur antiangiogénique), antagoniste du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et du PlGF (*placental growth factor*; facteur angiogénique), qui entraîne une vasoconstriction et une atteinte endothéliale<sup>306-309</sup> (Figure 19).



**Figure 19. Déséquilibre entre sFlt-1 (facteur anti-angiogénique) et PIGF (facteur angiogénique) dans la physiopathologie de la pré-éclampsie.**

Le ratio sFlt-1/PIGF est aujourd'hui un marqueur biologique sensible, précoce et spécifique, validé par des études multicentriques rétrospectives et prospectives pour le dépistage et le diagnostic de pré-éclampsie<sup>310-312</sup>. L'étude internationale prospective PROGNOSIS (*PRediction of short-term Outcome in preGNant wOmen with Suspected preeclampsia Study*) a notamment permis de mettre en évidence que chez les patientes enceintes au 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> trimestre, un ratio sFlt-1/PIGF inférieur à 38 permettait d'exclure la survenue d'une pré-éclampsie avec une valeur prédictive négative jusqu'à 99,3%. A l'inverse, un ratio sFlt-1/PIGF supérieur à 38 motive un suivi rapproché du fait d'une valeur prédictive positive de 36,7%<sup>310,313</sup>. Ce marqueur a également une valeur diagnostique, avec des seuils dépendant du terme de la grossesse : le diagnostic de pré-éclampsie est retenu si le ratio sFlt-1/PIGF est supérieur à 85 avant 34 SA et supérieur à 110 après 34 SA. Les algorithmes décisionnels de dépistage et diagnostic de pré-éclampsie en fonction du ratio sFlt-1/PIGF sont présentés dans la **Figure 20**.





**Figure 20. Stratégies d'utilisation du ratio sFlt-1/PIGF pour le dépistage et le diagnostic de prééclampsie.**

A ce jour, la place de ce biomarqueur dans le PTT obstétrical est inconnue. Une diminution précoce d'ADAMTS13 indépendante du VWF est également observée dans la pré-éclampsie, suggérant un rôle à ce jour mal compris d'ADAMTS13 dans la physiopathologie de la pré-éclampsie<sup>314</sup>. La prise en charge d'une pré-éclampsie repose sur une hospitalisation en urgence avec une extraction fœtale, qui est le seul traitement curatif.

L'éclampsie est définie par les critères d'une pré-éclampsie en association d'une crise convulsive<sup>315</sup>. C'est une complication rare de la grossesse (0,01 à 0,1 % des grossesses). Enfin, le HELLP syndrome correspond à la forme la plus sévère de cette entité. Il complique 0,5 à 0,9% des grossesses à l'échelle mondiale et 10 à 20% des pré-éclampsies sévères<sup>316</sup>. Ces entités sont des urgences vitales nécessitant une prise en charge associant du sulfate de magnésium, des anti-hypertenseurs et une extraction fœtale en urgence<sup>317</sup>.

### **b) Autres microangiopathies thrombotiques en contexte obstétrical**

Certaines MAT non spécifiques du contexte obstétrical peuvent également compliquer le diagnostic différentiel. Le SHUa peut survenir au cours de la grossesse ou en post-partum (16% des SHUa diagnostiqués chez des patientes en âge de procréer)<sup>318,319</sup>. Cette pathologie est liée à une anomalie de la voie alterne du complément, appartenant au système de l'immunité innée activé par certaines

surfaces (en particulier la paroi bactérienne). Il existe des facteurs de prédisposition génétique touchant les gènes codant pour le facteur H, le facteur I ou la protéine du cofacteur membranaire. Des facteurs déclenchants tels que les infections ou la grossesse ont également été rapportés. Ces anomalies conduisent à un défaut de répression du complément entraînant une hyperactivation de la C3 convertase et donc la production excessive d'anaphylatoxines C5a et du complexe d'attaque membranaire à la surface endothéliale, à l'origine de la MAT. Dans le SHUa, l'atteinte rénale est particulièrement marquée et peut conduire à une insuffisance rénale terminale, mais une atteinte neurologique voire cardiaque est possible. Le développement d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la fraction C5 du complément, l'éculizumab, a révolutionné le pronostic de cette pathologie. Des données de vie réelle et de pharmacovigilance permettent son utilisation en contexte obstétrical avec un profil de sécurité satisfaisant<sup>320-322</sup>.

Le syndrome catastrophique des antiphospholipides (CAPS) est la forme la plus sévère du syndrome des anti-phospholipides (SAPL), associant le phénotype biologique classique (anticoagulant lupique, anticorps anticardiolipine, anticorps anti- $\beta$ 2GPI) avec de multiples thromboses de la microcirculation et une défaillance multiviscérale. Cette atteinte fulminante engage le pronostic vital. Contrairement au SAPL « classique », une thrombopénie associée à une anémie hémolytique mécanique sont souvent retrouvées dans le CAPS, compliquant le diagnostic différentiel avec les autres MAT de la grossesse. Contrairement à la pré-éclampsie, le CAPS n'est pas spécifique de la grossesse mais il peut être déclenché par celle-ci<sup>323-325</sup>. De façon similaire, la grossesse peut entraîner une décompensation d'autres maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique, et entraîner un syndrome de MAT<sup>326</sup>.

La stéatose hépatique aiguë gravidique (SHAG) est une hépatopathie rare survenant classiquement au 3<sup>ème</sup> trimestre<sup>327</sup>. La SHAG est liée à une accumulation de lipides dans les hépatocytes avec parfois un déficit de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras, et elle entraîne une insuffisance hépatocellulaire sévère. La symptomatologie clinique est essentiellement abdominale (nausées, vomissements, douleurs épigastriques) avec une hypertension artérielle et une encéphalopathie hépatique dans les formes avancées. Le bilan biologique peut être évocateur d'un syndrome de MAT associé à une élévation des transaminases, une hyperuricémie et des perturbations du bilan d'hémostase. Le traitement repose essentiellement sur une extraction fœtale précoce et un traitement symptomatique.

Enfin, la CIVD résulte d'une activation systémique dérégulée de la coagulation et de la fibrinolyse, et provoque des thromboses dans la microcirculation par consommation des plaquettes (thrombopénie périphérique) et des facteurs et inhibiteurs de la coagulation. La CIVD peut entraîner un tableau de MAT et exposer à un risque hémorragique majeur engageant le pronostic vital. La CIVD obstétricale (hors hémorragie de la délivrance) est généralement secondaire à une autre complication obstétricale (MFIU, embolie amniotique ...) et nécessite une prise en charge en urgence reposant sur l'extraction fœtale et un traitement adapté aux troubles de l'hémostase (transfusions de produits sanguins labiles, antithrombotiques ou hémostatiques)<sup>328,329</sup>.

Le **Tableau 3** reprend le bilan clinique et biologique recommandé au diagnostic devant une suspicion clinique de MAT obstétricale.

**Tableau 3. Spécificités cliniques et biologiques permettant de discriminer les microangiopathies thrombotiques obstétricales (d'après Scully et al.<sup>294</sup>)**

| Pathologie            | Incidence/grossesses | Thrombopénie | HTA | Atteinte rénale | Atteinte neurologique | Activité d'ADAMTS13 |
|-----------------------|----------------------|--------------|-----|-----------------|-----------------------|---------------------|
| <b>Pré-éclampsie</b>  | 1/20                 | +++          | +++ | +/-             | ++                    | > 20 UI/dL          |
| <b>HELLP syndrome</b> | 1/1000               | ++++         | +   | +/-             | +/-                   | > 20 UI/dL          |
| <b>PTT</b>            | 1/200 000            | +++          | +   | +               | +++                   | < 10 UI/dL          |
| <b>SHUa</b>           | 1/25 000             | +++          | ++  | +++             | +                     | > 20 UI/dL          |

## 5. Spécificités de la prise en charge et du suivi

### a) Purpura thrombotique thrombocytopenique congénital révélé en contexte obstétrical

La prise en charge d'un PTTc révélé dans un contexte obstétrical est une urgence médicale nécessitant une prise en charge multidisciplinaire, idéalement dans un centre hospitalier regroupant des obstétriciens expérimentés dans les grossesses à risque et une unité de néonatalogie. Le premier axe thérapeutique repose sur l'apport d'ADAMTS13 exogène par des EP au PFC ou des perfusions de PFC. La viabilité fœtale (échographie fœtale et doppler des artères utérines) et le trimestre de survenue du PTT conditionnent la conduite à tenir. Si le PTT survient avant 24 SA, et que le fœtus est viable, la grossesse peut être poursuivie dès lors que le PTT atteint la rémission. Après 24 SA, une extraction fœtale pourra être envisagée selon le choix de l'obstétricien, bien qu'un accouchement par voie basse soit privilégié<sup>160</sup>. Dans le PTTc, il est rapporté que les patients ont besoin de moins de PFC lors des poussées que les PTTi et certaines patientes atteignent la rémission avec de simples perfusions de PFC.

Le diagnostic de PTTc entraîne un suivi au long cours, avec plusieurs implications importantes. Une enquête familiale peut être proposée à la patiente afin d'identifier des variations de séquences du gène *ADAMTS13* dans la famille et d'accompagner un éventuel projet parental. Classiquement, les patients PTTc diagnostiqués à l'âge adulte ne nécessitent pas de prophylaxie au long cours par administration de PFC comme la plupart des PTTc révélés dans l'enfance. Toutefois, il est bien établi que le risque de rechute à l'occasion d'une grossesse ultérieure est de 100%<sup>160</sup>. Un encadrement médical étroit est proposé à toute patiente PTTc ayant un projet de grossesse. Une administration hebdomadaire ou bimensuelle de PFC (10 à 15 mL/kg) est commencée dès le début de la grossesse jusqu'à 4-6 semaines en post-partum, en association avec une surveillance clinique, biologique (numération formule sanguine, LDH) et échographique (échographie fœtale, doppler des artères utérines) rapprochée. Le déclenchement d'un accouchement par voie basse à 36-37 SA est privilégié<sup>160,292</sup>. Ce protocole

empirique est très efficace. Dans une étude rétrospective, Sakai et al.<sup>330</sup> rapportent 38 grossesses (21 patientes PTTc), séparées en deux groupes : un groupe a reçu des perfusions prophylactiques de plasma hebdomadaires, l'autre non. Le taux de survie fœtale dans le premier groupe est de 91,7% contre 50% dans le second. La survie fœtale dans ce second groupe était également fonction du terme de la grossesse (avec un taux de survie fœtale augmenté si le PTT survenait après 20 SA). Toutefois, malgré une plasmathérapie prophylactique et un encadrement étroit de la grossesse, la survenue d'une rechute de PTT et d'une perte fœtale reste possible<sup>331,332</sup>. De plus, Phelps et al.<sup>333</sup> ont rapporté le cas d'une patiente PTTc diagnostiquée à l'âge de 11 ans et nécessitant une prophylaxie au long cours par PFC. Ses deux grossesses ont été marquées par une pré-éclampsie sévère avec MFIU. Cette observation souligne qu'il existe une probable variabilité inter-individuelle au PFC. La transition à l'âge adulte de ces patientes PTTc pédiatriques, en particulier la prise en charge de leur première grossesse, est mal connue à ce jour.

#### **b) Purpura thrombotique thrombocytopenique acquis de révélation obstétricale**

La prise en charge du PTT acquis de révélation obstétricale repose en premier lieu sur l'apport d'ADAMTS13 exogène par des échanges plasmatiques (40-60 mL/kg). Le traitement immunosuppresseur est initialement limité aux glucocorticoïdes à fortes doses. L'utilisation du rituximab, de l'azathioprine ou d'inhibiteurs de calcineurine est conditionnée par la documentation d'une auto-immunité anti-ADAMTS13 (compte tenu de la fréquence élevée de la forme congénitale de PTT) et par la balance bénéfico-risque liée au passage transplacentaire des immunosuppresseurs. Le rituximab en particulier est associé à des cytopénies néonatales et un risque accru d'infection, et son utilisation avant extraction fœtale doit être évitée<sup>334,335</sup>. Des cas de PTTi obstétricaux traités par rituximab avant extraction fœtale avec succès ont néanmoins été rapportés<sup>336</sup>. En 2022, le caplacizumab n'a pas d'indication en contexte obstétrical. Kühne et al. (Cologne, Allemagne) rapportent toutefois son utilisation chez une patiente présentant un PTTi gravissime au cours d'une grossesse, après discussion pluridisciplinaire et échec de multiples options thérapeutiques. L'issue de cette poussée de PTTi s'est traduite par une MFIU, permettant d'objectiver le passage transplacentaire du caplacizumab<sup>337</sup>. La place de ce traitement dans le PTT obstétrical avant extraction fœtale reste à définir. L'extraction fœtale est recommandée sur décision obstétricale dès lors que l'état clinique de la mère est satisfaisant, que l'âge gestationnel de 24 SA est atteint et/ou qu'il existe des signes de souffrance fœtale.

Une fois la rémission du PTT atteinte, la grossesse peut être poursuivie, avec un monitoring clinique et biologique étroit de la mère et du fœtus<sup>160</sup>, notamment via une surveillance rapprochée (hebdomadaire à mensuelle) de l'activité d'ADAMTS13, avec pour un objectif un maintien de l'activité d'ADAMTS13 supérieure au seuil protecteur de 20-25 UI/dL<sup>160,338</sup>. Un diagnostic de PTTi au cours d'une grossesse expose à un risque de rechute, pouvant survenir à l'occasion d'une grossesse ultérieure comme en dehors de toute grossesse. Un diagnostic de PTTi hors contexte obstétrical chez une femme en âge de procréer doit faire considérer le risque d'une rechute à l'occasion d'une grossesse ultérieure. Une grossesse ultérieure est donc une période à risque nécessitant une surveillance accrue. La surveillance repose notamment sur la mesure de l'activité d'ADAMTS13. La question de l'encadrement d'une nouvelle grossesse est centrale dans la prise en charge de ces patientes. Si celles-ci étaient

découragées dans les années 1990-2000, le consensus actuel est d'encadrer les patientes dans leur projet. Il est toutefois crucial de les informer qu'une rechute biologique ou clinique, ainsi que ses conséquences sur la morbi-mortalité materno-fœtale, ne pourra jamais être exclue. Le projet parental doit idéalement être débuté avec une activité d'ADAMTS13 normale, ou normalisée par un traitement préemptif par rituximab suivi d'une période de 6-12 mois<sup>160,294,338</sup>, avec comme objectif de maintenir l'activité d'ADAMTS13 au moins supérieure à 25% tout au long de la grossesse. En cas de rechute biologique, le traitement repose sur l'utilisation de corticostéroïdes et les échanges plasmatiques prophylactiques peuvent être discutés. Le rituximab n'est à l'heure actuelle pas indiqué dans cette situation mais peut être discuté au cas par cas. L'accouchement par voie basse est privilégié.

## **6. Recommandations internationales de prise en charge**

En 2020, un panel international d'experts de l'*International Society for Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) a publié des recommandations sur le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de PTT<sup>209,241,253</sup>. Les recommandations portant sur le PTT en contexte obstétrical sont résumées dans le **Tableau 4**.

**Tableau 4. Recommandations internationales pour le diagnostic et la prise en charge du purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical**

| <b>Item</b>   | <b>Recommandation – PTTi</b>  | <b>Recommandation - PTTc</b>  |
|---|---|---|
| <b>Intérêt des scores de probabilité clinico-biologique (French score ou PLASMIC score)</b> | Non validé  | Non validé  |
| <b>Antécédent de PTT et désir de grossesse</b>  | Conseil pré-conceptionnel pour informer des modalités d'encadrement de la grossesse et des risques encourus<br><br>Normalisation de l'activité d'ADAMTS13 (traitement pré-emptif par rituximab suivi d'un délai de 6 à 12 mois) | Conseil pré-conceptionnel pour informer des modalités d'encadrement de la grossesse et des risques encourus   |
| <b>Antécédent de PTT et grossesse en cours</b>  | Encadrement pluridisciplinaire par des cliniciens experts<br><br>Suivi biologique :<br>- activité d'ADAMTS13 mensuelle (objectif > 25 UI/dL)<br>- hémogramme mensuel  | Encadrement pluridisciplinaire par des cliniciens experts<br><br>Plasmathérapie prophylactique par administration régulière de PFC<br><br>Suivi biologique :<br>- recherche d'allo-immunisation anti-ADAMTS13 mensuelle<br>- hémogramme mensuel |
| <b>Antécédent de PTT et rechute biologique au cours d'une grossesse</b>                     | Indication à un traitement pour normaliser l'activité d'ADAMTS13 (modalités de traitement non consensuelles)  |   |
| <b>Antécédent de PTT et traitement antithrombotique au cours d'une grossesse</b>            | Traitement antithrombotique par aspirine non recommandé.<br><br>Traitement antithrombotique par héparines de bas poids moléculaires non consensuel  |   |
| <b>Accouchement</b>   | Déclenchement à 36-37 SA<br>Privilégier un accouchement par voie basse  |   |
| <b>Contraception</b>  | Privilégier les contraceptions non-hormonales ou progestatives seules   |   |

## OBJECTIFS

L'étude des différents registres nationaux et internationaux a permis d'identifier le contexte obstétrical comme l'une des principales situations cliniques retrouvées en association avec le PTT. Depuis une quinzaine d'années, des études internationales spécifiquement dédiées aux patientes atteintes de PTT de la grossesse ou du post-partum<sup>131,138,145,155,339</sup> ont mis en évidence un certain nombre de spécificités, notamment la fréquence particulièrement élevée des formes congénitales, la difficulté du diagnostic différentiel vis-à-vis des autres syndromes de MAT obstétricales et l'absence de recommandations de prise en charge codifiées. Toutefois, ces études ne portent que sur un nombre relativement faible de patientes (cohortes d'effectif inférieur à 100), et se limitent le plus souvent à une étude exhaustive de la phase inaugurale du PTT sans analyse étayée du suivi au long cours des patientes. De plus, aucune étude publiée à ce jour sur le PTT obstétrical n'en a démembré la physiopathologie en utilisant des outils biologiques originaux dépassant la simple investigation phénotypique et génotypique focalisée sur ADAMTS13.

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre le PTT obstétrical, en particulier sa physiopathologie, les points clés de son diagnostic, son champ thérapeutique ainsi que son pronostic à court, moyen et long terme. Pour ce faire, nous avons réalisé un travail qui s'articule autour de 3 principaux axes :

- Le premier axe est méthodologique et concerne l'étude phénotypique du couple VWF/ADAMTS13. Un premier volet est dédié à l'étude de la répartition des multimères du VWF à la phase aiguë du PTT par une méthode semi-automatisée, ainsi qu'une confrontation à la présentation clinico-biologique. Le second volet est consacré à la mesure de l'activité d'ADAMTS13 et s'appuie sur l'évaluation d'une part d'un test rapide d'orientation diagnostique pour le dépistage d'un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 et d'autre part, d'une méthode automatisée et rapide de mesure de l'activité d'ADAMTS13. Cet axe a pour but une évaluation des performances analytiques et diagnostiques de ces méthodes biologiques afin d'en déterminer la pertinence en situation de vie réelle devant une suspicion clinique de MAT obstétricale.
- Le deuxième axe est translationnel : il est consacré à l'étude rétrospective de la cohorte de patientes atteintes de PTT obstétrical du registre français du CNR-MAT, de la présentation clinique inaugurale au suivi des grossesses ultérieures. Cette étude permettra notamment d'aider au diagnostic différentiel du PTT par rapport aux autres MAT d'une part, au diagnostic différentiel entre les formes acquises et congénitales de PTT d'autre part. L'analyse des données portant sur le suivi des grossesses ultérieures de ces patientes aidera à encadrer ces projets parentaux parfois difficiles compte tenu d'un risque de rechute élevé. Le versant épidémiologique de l'étude sera complété par une exploration fine des mécanismes physiopathologiques, grâce à des biomarqueurs innovants dans ce contexte tels que la mesure de l'activité d'ADAMTS13 par une méthode de chimiluminescence, l'étude de la conformation d'ADAMTS13 et l'étude des facteurs angiogéniques impliqués dans la prééclampsie (sFlt-1 et PlGF).

- Enfin, le troisième et dernier axe de cette thèse est fondamental puisqu'il est consacré à la recherche d'une part, de facteurs génétiques potentiellement impliqués dans le développement du PTTi (mutation R1060W du gène *ADAMTS13* précédemment suggérée mais non étayée dans la littérature internationale) et d'autre part, de facteurs génétiques modulateurs de l'expression clinique du PTTc. A cet égard, le service de génétique moléculaire du CHU de Nantes avec lequel nous travaillons a développé le séquençage à haut débit de gènes codant pour des protéines de l'hémostase impliquées dans la formation des microthrombi (*VWF*, *F8*, *ADAMTS13*, *GP1BA*, *ITGA2B*, *ITGB3*). Leur étude dans le PTTc, *a fortiori* en contexte obstétrical, peut révéler d'autres facteurs de susceptibilité individuelle permettant de mieux comprendre cette pathologie. Ce dernier axe a été appréhendé grâce à une collaboration avec le Dr. Pierre Boisseau (service de génétique moléculaire du CHU de Nantes, Pr. Stéphane Bézieau) et le Pr. Corinne Collet (UF de génétique moléculaire, service de biochimie et biologie moléculaire de l'Hôpital Lariboisière, Pr. Jean-Louis Laplanche).



# PATIENTS, MATERIEL ET METHODES

## I. Patientes, recueil de données cliniques et prélèvements biologiques

### 1. Le CNR-MAT

Le CNR-MAT, créé en 2006 dans le cadre du Plan National Maladies Rares 1 (PNMR-1) porté par la direction générale de l'offre de soins (DGOS) du Ministère des Solidarités et de la Santé, a été relabellisé en 2013 (PNMR2) puis en 2018 (PNMR3). Ce Centre de Référence Maladies Rares (CRMR) comprend un centre coordonnateur (Pr Paul Coppo à l'Hôpital Saint-Antoine, APHP.Sorbonne Université), 5 sites constitutifs et 21 centres de compétences répartis sur l'ensemble du territoire français (**Figure 21**). Deux laboratoires de référence sont associés au CNR-MAT : le laboratoire d'immunologie de l'Hôpital européen Georges Pompidou (dont l'expertise repose sur l'exploration du complément, Dr Véronique Frémeaux-Bacchi, APHP.Centre, Université Paris Cité) et le service d'hématologie biologique de l'Hôpital Lariboisière (dont l'expertise repose sur l'exploration de la protéase ADAMTS13, Pr Agnès Veyradier, APHP.Nord, Université Paris Cité). Le service d'hématologie biologique de l'Hôpital Lariboisière est une structure hospitalo-universitaire associant une plateforme de biologie médicale hyper-spécialisée de prestation nationale et une activité de recherche clinique et translationnelle. L'activité universitaire de recherche est réalisée au sein du groupe « Microangiopathies thrombotiques » de l'équipe « Cohortes rares en immuno-hématologie », hébergé par l'URP-3518 « Recherche clinique en hématologie, immunologie et transplantation » (Pr. Hervé Dombret) de l'Institut de Recherche Saint-Louis, Université Paris Cité.

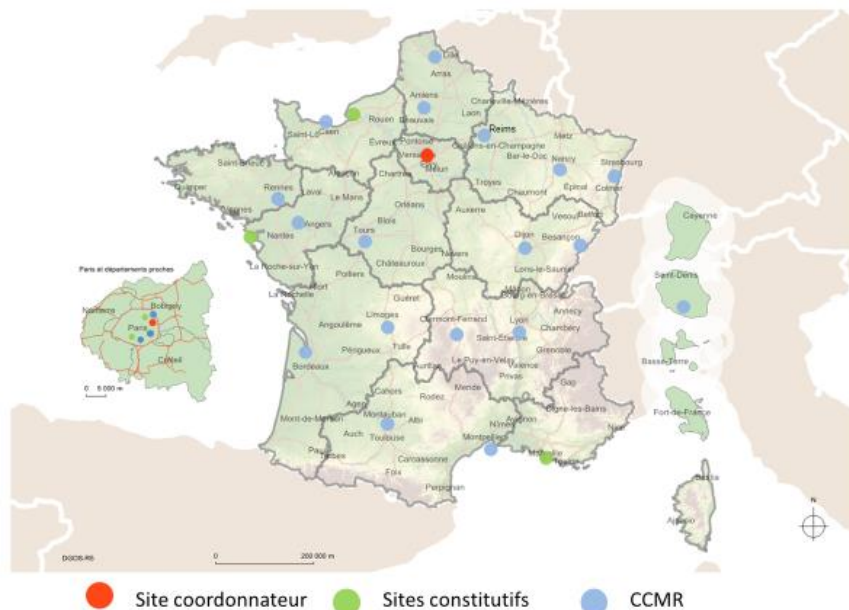


Figure 21. Maillage territorial du CNR-MAT.

## 2. Registre du CNR-MAT et critères d'inclusion

Ce travail de thèse est une étude ancillaire du Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) « Facteurs pronostiques dépendant d'ADAMTS13 dans le purpura thrombotique thrombocytopenique de l'adulte et de l'enfant » (matricule DRCD AOM05012/P051064), dont l'investigateur coordonnateur est le Pr. Paul Coppo et la responsable scientifique le Pr. Agnès Veyradier. Le comité consultatif de protection des personnes a émis un avis favorable pour cette étude le 26 avril 2006. Les critères d'inclusion généraux de ce PHRC pour les patients adultes sont les suivants : diagnostic clinique de PTT, activité d'ADAMTS13 indétectable (<10 UI/dL), hémoglobine < 10 g/dL et/ou plaquettes < 150 G/L, affiliation à un régime de sécurité sociale et consentement éclairé signé. Les informations cliniques et biologiques ont été obtenues par un recueil des données à partir des comptes-rendus d'hospitalisation. Des critères d'inclusion ou d'exclusion spécifiques s'appliquent à chaque partie de ce travail.

## 3. Prélèvements biologiques

Les prélèvements sanguins sont recueillis sur tube citraté 3,2% (plasma) principalement, tube sec (sérum) ou tube EDTA (sang total). Les échantillons de plasma citraté et de sérum sont centrifugés selon les recommandations pré-analytiques du Groupe Français d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose à 2000-2550 g pendant 10 minutes dans les 4 heures suivant le prélèvement. Le plasma pauvre en plaquettes ou le sérum sont conservés à -20°C ou -80°C dans la bio-banque du laboratoire ADAMTS13 (CRB-LRB, bio-banque BB-0033-00064 certifiée NFS96-900). L'étude génétique est réalisée à partir d'ADN extrait de sang total EDTA conservé à 4°C (moins de 72 heures) ou -20°C. Le consentement libre et éclairé du patient (ou de son représentant légal) en vue de réaliser une analyse de génétique moléculaire constitutionnelle accompagne le prélèvement dédié.

## II. Matériel et Méthodes

### 1. Estimation du degré de multimérisation du facteur Willebrand

#### a) Mesure antigénique du facteur Willebrand (VWF:Ag)

La mesure du VWF:Ag est réalisée par une méthode immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) avec la trousse commerciale ASSERACHROM® VWF:Ag selon les recommandations du fournisseur (Stago, Asnières-sur-Seine, France). Un contrôle interne de qualité (CIQ) de niveau normal (cible autour de 80 UI/dL) et un calibrant sont inclus dans cette trousse commerciale. Les puits de la plaque ELISA sont recouverts d'anticorps de lapin anti-VWF humain. Les plasmas citratés sont dilués au 1/51<sup>ème</sup> dans le tampon de dilution (tampon phosphate). Pour chaque plasma, 200 µL de la précédente dilution sont déposés dans un puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, la plaque est lavée 5 fois avec le tampon de lavage puis 200 µL d'anticorps de lapin anti-VWF humain couplés à la peroxydase sont déposés dans chaque puits avant une nouvelle incubation d'une heure. Après 5 lavages, 200 µL de substrat chromogène de la peroxydase (TMB, 3,3',5,5' – tetramethylbenzidine) sont ajoutés à chaque puits. La réaction d'oxydation résultant est arrêtée après 5 minutes exactement par addition de 50 µL d'acide sulfurique 1M. L'intensité de la

coloration jaune obtenue est proportionnelle au VWF:Ag, et l'absorbance est lue par spectrophotométrie à 450 nm (spectrophotomètre MULTISKAN FC®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) et comparée à la gamme de calibration. Les résultats sont exprimés en UI/dL. Les valeurs usuelles sont comprises entre 50 et 100 UI/dL.

#### **b) Mesure de la capacité de liaison du facteur Willebrand au collagène (VWF:CB)**

Les échantillons plasmatiques ayant une concentration en VWF:Ag supérieure à 100 UI/dL doivent être préalablement dilués dans le tampon de dilution afin d'obtenir une concentration finale égale à 100 UI/dL. Une mesure préalable du VWF:Ag est donc nécessaire. La mesure du VWF:CB est effectuée par une méthode immuno-enzymatique de type ELISA avec la trousse commerciale ASSERACHROM® VWF:CB selon les recommandations du fournisseur (Stago, Asnières-sur-Seine, France). Un CIQ de niveau normal (cible autour de 80 UI/dL) et un calibrant sont inclus dans cette trousse commerciale. Les puits sont recouverts de collagène humain placentaire de type III. Les plasmas sont dilués au 1/51<sup>ème</sup> dans le tampon de dilution. Après une heure d'incubation, la plaque est lavée 5 fois avec le tampon de lavage puis 200 µL d'anticorps de lapin anti-VWF-humain couplés à la peroxydase sont déposés dans chaque puits puis incubés pendant une heure à température ambiante. Après 5 lavages de la plaque, 200 µL de TMB sont ajoutés. La réaction d'oxydation résultant est arrêtée après 5 minutes exactement par addition de 50 µL d'acide sulfurique 1M. L'intensité de la coloration jaune obtenue, proportionnelle à la concentration de VWF fixé par le collagène, est lue par spectrophotométrie à 450 nm (spectrophotomètre MULTISKAN FC®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) et comparée à la gamme de calibration. Les résultats sont exprimés en ratio VWF:CB/VWF:Ag et en pourcentage VWF:CB. Les valeurs usuelles du fournisseur comprises entre 0,82 et 1,18 (ratio VWF:CB/VWF:Ag) ou 82-118% (VWF:CB).

#### **c) Electrophorèse des multimères du facteur Willebrand**

La répartition des multimères du VWF est étudiée à l'aide du système semi-automatique HYDRASIS 2® avec un gel d'agarose hautement réticulé HYDRAGEL von WILLEBRAND MULTIMERS® selon les recommandations du fournisseur (Sebia, Lisses, France). Chaque gel comprend 11 puits. Les échantillons plasmatiques sont dilués pour obtenir une concentration de VWF:Ag égale à 10 UI/dL dans le tampon de dilution fourni puis prétraités dans un détergent anionique (fourni dans la trousse commerciale) pendant 20 minutes dans un bain-marie à 45°C. Ce prétraitement au détergent permet de masquer les charges intrinsèques des protéines, de dénaturer leur forme native, entraînant la formation de complexes détergent anionique – protéine présentant des conformations et des charges par unité de masse identiques. La migration dans le gel d'agarose n'est donc plus dépendante de la charge mais uniquement de la masse moléculaire. Cinq µL de chaque échantillon prétraité sont déposés dans les puits du gel d'agarose. Dans chaque gel, un pool de plasmas issus d'individus sains et utilisé comme référence, est déposé en positions latérales (pistes 1 et 11). Une électrophorèse automatisée de 1h45 permet de séparer les multimères de VWF selon leur taille : la migration est d'autant plus rapide que le poids moléculaire est faible. Un marquage est réalisé par immunofixation avec des anticorps polyclonaux mammifères anti-VWF humain pendant une heure, puis avec des anticorps anti-immunoglobulines couplés à la peroxydase pendant 30 minutes. La révélation est effectuée par ajout

d'une solution de tétrathiafulvalène et de peroxyde d'hydrogène pendant 10 minutes. Après lavage et séchage, le gel est scanné par l'automate HYDRASIS2®. Le logiciel PHORESIS version 8.6.3 du fournisseur permet l'intégration des gels par calcul de l'aire sous la courbe et permet de quantifier les différentes fractions (VWF-BPM, VWF-PMI, VWF-HPM). Le taux de VWF-HPM est également calculé en multipliant le pourcentage de VWF-HPM obtenu par électrophorèse par le taux de VWF:Ag déterminé pour chaque échantillon. Ces résultats sont exprimés en UI/dL.

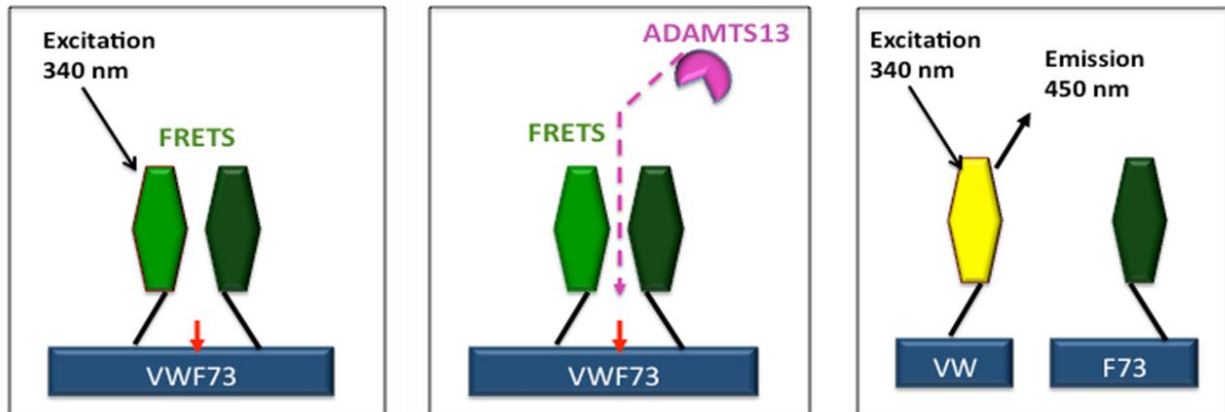
## 2. Exploration biologique d'ADAMTS13

Toutes les méthodes de mesure de l'activité d'ADAMTS13 partagent un principe similaire, la détection et la quantification des produits de dégradation du substrat, le VWF (VWF *full-length* ou court peptide VWF73), par l'ADAMTS13 contenue dans l'échantillon à tester. Les valeurs usuelles sont comprises entre 50 UI/dL et 150 UI/dL quelle que soit la technique.

### a) Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par la méthode de référence FRET-VWF73

L'activité d'ADAMTS13 est mesurée par la méthode de référence, publiée par Kokame et al. En 2005<sup>219</sup> et adaptée dans notre laboratoire. Le substrat utilisé est le FRET-VWF73® (Peptide Institute, Osaka, Japon). Cette technique mesure la vitesse d'hydrolyse du FRET-VWF73® par ADAMTS13. Le FRET-VWF73® est un peptide synthétique composé d'une séquence de 73 acides aminés issue du VWF, représentant le substrat minimal d'ADAMTS13, et porte un fluorochrome et un absorbeur d'énergie situés de part et d'autre du site de clivage par ADAMTS13 (**Figure 22**). Après excitation à 340 nm, l'énergie émise par le fluorochrome est captée par l'absorbeur si le peptide est intact (pas de clivage par ADAMTS13). En revanche, si le peptide est clivé, l'énergie émise par le fluorochrome sous la forme d'un photon à 450 nm est libérée dans le milieu réactionnel pour être détectée. La pente de la courbe représentant la fluorescence émise au cours du temps est proportionnelle à l'activité d'ADAMTS13. Quatre-vingt-quinze µL de chaque échantillon (plasma citraté ou sérum) sont traités par 5 µL d'un inhibiteur de sérines protéases, le Pefabloc® (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) et incubés pendant 10 minutes à température ambiante. Un pool de plasmas normaux (*normal pooled plasma*, NPP et CRYOcheck pooled normal plasma, Cryopep, Montpellier, France) est étalonné contre le standard international<sup>340</sup> (NIBSC, Potters Bar, Hert Fordshire, UK Official Medicines Control Laboratory, Ridge, Royaume-Uni). Une gamme d'étalonnage est réalisée avec le NPP dilué dans du tampon Bis-Tris (5 mM Bis-Tris, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,005% Tween-20, pH 6), de 0 à 100 UI/dL. Un CIQ CRYOcheck Normal Reference Plasma®, un CIQ CRYOcheck Abnormal Reference plasma® (Cryopep, Montpellier, France) et un échantillon de patient PTT connu (activité < 10 UI/dL) sont utilisés comme contrôles dans chaque série. Les échantillons et les contrôles sont testés à deux dilutions différentes : au 1/10<sup>ème</sup> (15 µL dans 135 µL de tampon Bis Tris) et au 1/20<sup>ème</sup> (15 µL dans 285 µL de tampon Bis Tris). Le FRET-VWF73® est un substrat lyophilisé qui doit être reconstitué par solubilisation dans un mélange de 35 µL de diméthylsulfoxyde et de 105 µL d'eau distillée. Cinquante µL de chaque échantillon (gamme d'étalonnage, blanc, patients, contrôles) sont déposés dans les puits d'une microplaque 96 puits noire Greiner (NUNC® micro-puits) et 50 µL de FRET-VWF73® dilué au 1/50<sup>ème</sup> en tampon Bis-Tris sont ajoutés à chaque puits. La plaque est immédiatement insérée dans

un fluorimètre FLUOROSKAN ASCENT® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) qui effectue une mesure de la fluorescence ( $\lambda$  excitation à 340 nm et  $\lambda$  détection de l'émission à 450 nm) toutes les 5 minutes pendant 1 heure. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité d'ADAMTS13 par rapport au NPP.



**Figure 22. Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par la méthode de Kokame**

**b) Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par une méthode immuno-enzymatique chromogénique**

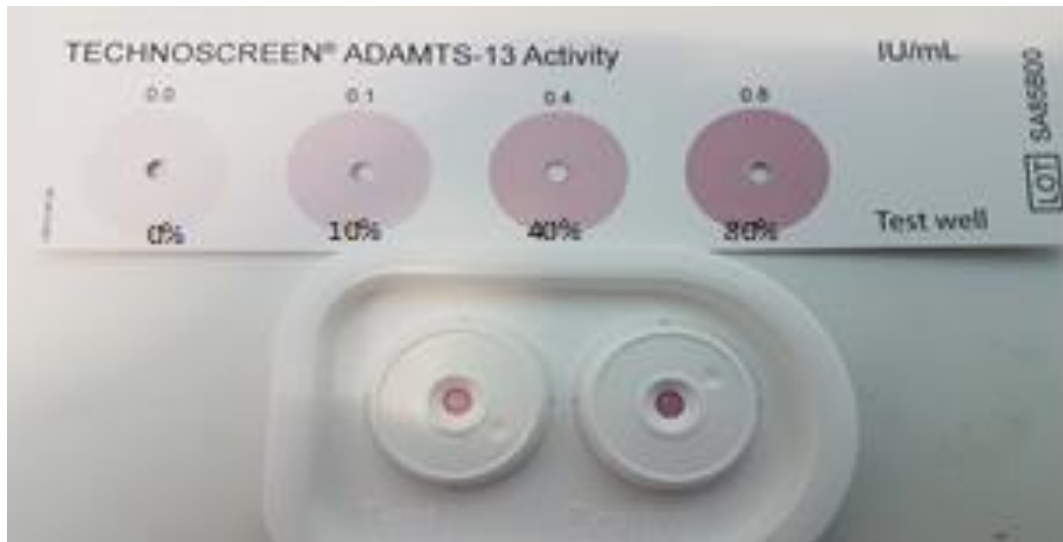
La mesure de l'activité d'ADAMTS13 par une méthode immuno-enzymatique chromogénique de type ELISA (Chr-VWF73) est effectuée avec la trousse commerciale TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity (Technoclone, Vienne, Autriche) selon les recommandations du fournisseur. Les puits de la plaque ELISA sont recouverts d'anticorps anti-GST (*glutathione-S-transferase*). Le substrat lyophilisé GST-VWF73 est reconstitué avec 6 mL d'eau distillée. La plaque est incubée pendant une heure avec le substrat GST-VWF73 à température ambiante. Les calibrants et les contrôles fournis dans la trousse commerciale sont reconstitués avec 500  $\mu$ L d'eau distillée, stabilisés pendant 15 minutes puis agités pendant 10 secondes. Les échantillons plasmatiques de patients, les contrôles et les calibrants sont dilués au 1/31<sup>ème</sup> (5  $\mu$ L dans 150  $\mu$ L de tampon de dilution fourni). Après trois lavages successifs avec le tampon de lavage fourni, 100  $\mu$ L de chaque échantillon sont déposés en double dans les micro-puits. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, la plaque est une nouvelle fois lavée trois fois. Cent  $\mu$ L d'une solution d'anticorps-mono-clonal anti-N10 (correspondant à un produit de dégradation du VWF spécifique du clivage par ADAMTS13) conjugué à l'HRP (*horseradish peroxydase*) sont déposés dans chaque puits. Après une heure d'incubation à température ambiante et trois lavages successifs de la plaque, 100  $\mu$ L de substrat chromogène TMB sont déposés dans chaque puits pour 30 minutes. La réaction est arrêtée par ajout de 100  $\mu$ L d'acide sulfurique 0,5 M. L'activité d'ADAMTS13 est proportionnelle à l'intensité de coloration du milieu réactionnel, quantifié par spectrophotométrie à 450 nm (MULTISKAN FC®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).

### **c) Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par une méthode immunologique en chimiluminescence automatisée**

Une nouvelle méthode rapide et automatisée de la mesure de l'activité d'ADAMTS13 a été développée en 2017<sup>223</sup>, HemosIL AcuStar® ADAMTS13 activity assay, sur un photo-automate ACL AcuStar® (Instrumentation Laboratory, Bedford, Massachusetts, Etats-Unis). Un calibrant et deux niveaux de CIQ sont fournis. La première étape consiste à incuber le plasma du patient dans un tampon de dosage contenant des particules magnétiques en phase solide couplées à un anticorps anti-GST et recouvertes du substrat peptidique GST-VWF73. L'ADAMTS13 présente dans le milieu réactionnel clive le GST-VWF73 proportionnellement à son activité. Après séparation magnétique et lavage, un anticorps anti-N10 couplé à l'isoluminol est ajouté et fixe les produits de dégradation du GST-VWF73 par ADAMTS13. Après lavage, la réaction de chimiluminescence est déclenchée. La chimiluminescence émise, proportionnelle à l'activité d'ADAMTS13, est détectée, quantifiée et exprimée en unités de lumières relatives (*RLU relative light units*) par le système optique ACL Acustar®. Les réactifs sont introduits dans l'automate sous la forme de cartouche contenant un flacon de particules magnétiques lyophilisées couvertes de GST-VWF73, un flacon de tampon de dosage et un flacon d'anticorps de révélation couplé à l'isoluminol. Chaque cartouche permet de réaliser 25 tests. Un tampon de re-suspension (1,4 mL) doit être ajouté à chaque cartouche avant d'être introduite dans l'automate. Une calibration doit être effectuée à chaque changement de lot de réactif. Chaque série de mesure comprend trois CIQ comme pour la mesure par technique FRET-S-VWF73 (2 niveaux de CIQ du fournisseur et 1 plasma PTT connu).

### **d) Mesure semi-quantitative de l'activité d'ADAMTS13 par un test rapide d'orientation diagnostique**

La trousse commerciale Technoscreen® ADAMTS-13 Activity (Technoclone, Vienne, Autriche) est un test rapide d'orientation diagnostique (TROD) proposant une mesure semi-quantitative de l'activité d'ADAMTS13 en moins de 30 minutes. Cette trousse comprend l'ensemble du matériel nécessaire (support solide, pipettes, flacons d'incubation, réactifs) prêt à l'emploi pour une utilisation en urgence dans un service clinique ou dans un laboratoire de biologie médicale délocalisée. Chaque support solide comprend une membrane « patient » recouverte d'anticorps anti-N10 et une membrane « contrôle » recouverte d'anticorps polyclonaux couplés à la GST et dirigés contre le VWF73 entier ou clivé. Une prise d'essai de 300 µL de plasma citraté, prélevée avec une pipette jetable pré-jaugée incluse dans la trousse commerciale, est ajoutée à un flacon contenant du GST-VWF73 lyophilisé. Après 20 minutes d'incubation, une goutte de tampon de lavage (contenant du PBS et du détergent) est déposée sur chaque membrane du support plastique. Après absorption, 60 µL du mélange plasma-VWF sont déposés sur chaque membrane : l'absorption doit être totale en moins de 50 secondes. Une goutte d'anticorps anti-GST biotinylé est ajoutée sur chaque membrane pour lier les complexes immuns. Après absorption, une nouvelle goutte de tampon de lavage est ajoutée. Une goutte d'une solution de microbilles d'or conjuguées à la streptavidine est ajoutée à chaque membrane et produit une coloration rouge dont l'intensité est proportionnelle à l'activité d'ADAMTS13. L'intensité de coloration est comparée à un carton avec les couleurs de référence fourni, permettant une appréciation visuelle semi-quantitative de l'activité d'ADAMTS13 aux seuils de 0, 10, 40 et 80 UI/dL (**Figure 23**).



**Figure 23. Exemple de test rapide d'orientation diagnostique Technoscreen® ADAMTS13 activity.**

#### **e) Recherche et titrage des anticorps anti-ADAMTS13**

La recherche et le titrage des IgG anti-ADAMTS13 sont effectués en cas de déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 (activité < 10 UI/dL) par une méthode immuno-enzymatique de type ELISA avec la trousse commerciale TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH (Technoclone, Vienne, Autriche) selon les recommandations du fournisseur. Cette technique détecte les anticorps circulants mais elle ne permet pas de mettre en évidence les CIC. Les puits sont recouverts d'ADAMTS13 recombinante sauvage. Les calibrants et les 2 niveaux de CIQ fournis dans la trousse commerciale sont reconstitués avec 500 µL d'eau distillée, stabilisés pendant 15 minutes puis agités pendant 10 secondes. Les échantillons de plasma sont dilués au 1/100<sup>ème</sup> dans un tampon de dilution. Cent µL de plasma dilué sont déposés dans les puits et incubés pendant une heure à température ambiante. Après trois lavages successifs avec 200 µL de tampon de lavage, 100 µL d'anticorps anti-IgG humaine couplé à la peroxydase sont ajoutés pour une nouvelle incubation d'une heure. Après trois lavages successifs, 100 µL de substrat TMB sont ajoutés dans chaque puits pour déclencher la réaction, qui est arrêtée après 10 minutes exactement par ajout de 100 µL d'acide sulfurique 1 M. L'absorbance du milieu réactionnel est lue à 450 nm (MULTISKAN FC®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis), et les résultats sont exprimés en U/mL par rapport à une courbe de calibration. Le seuil de positivité du fournisseur est de 15 U/mL.

### **3. Etude de la conformation d'ADAMTS13**

Les anticorps murins anti-hADAMTS13 (ADAMTS13 humaine) utilisés pour la mesure de l'antigène ADAMTS13 et pour l'étude de la conformation d'ADAMTS13 nous ont été fournis par le Pr Karen Vanhoorelbeke (*Laboratory for thrombosis research*, KU Leuven, Courtrai, Belgique). L'anticorps 3H9

est dirigé contre un épitope situé dans le domaine métalloprotéase<sup>341</sup>. L'anticorps 1C4 reconnaît un épitope cryptique situé dans le domaine *spacer*<sup>197</sup>. L'anticorps 17G2 est dirigé contre un épitope situé dans le domaine CUB1<sup>342</sup>. Enfin, l'anticorps 19H4 est dirigé contre un épitope localisé domaine TSP1-8<sup>97</sup>.

#### **a) Mesure de l'antigène d'ADAMTS13 (3H9-ELISA)**

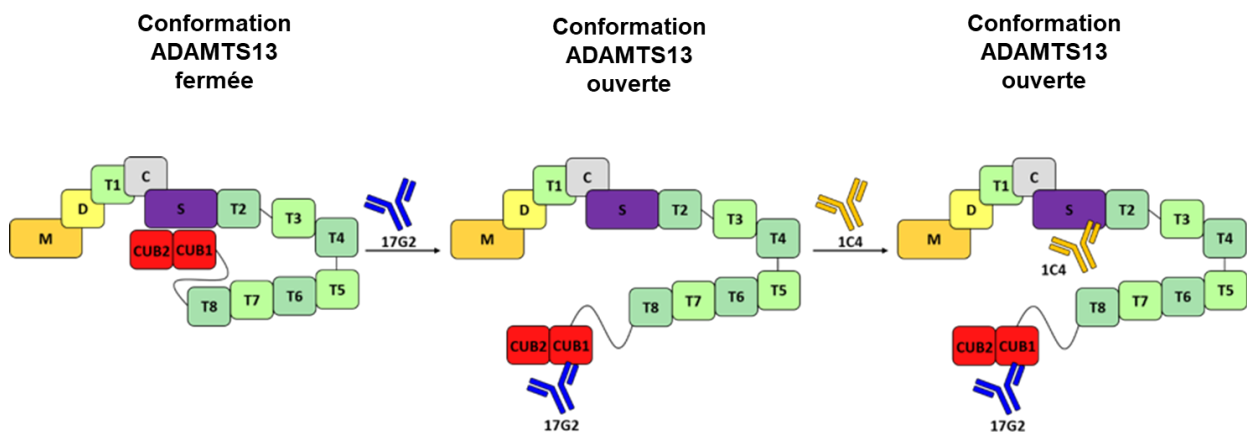
La mesure de l'antigène d'ADAMTS13 est effectuée par une méthode immuno-enzymatique de type ELISA d'après la méthode décrite par Alwan et al<sup>343</sup>. Cette méthode est basée sur la reconnaissance d'ADAMTS13 par l'anticorps murin anti-hADAMTS13 3H9<sup>341</sup>. Cent µL d'une solution d'anticorps 3H9 diluée à 5 µg/mL dans un tampon carbonate/bicarbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 0,05 M, pH 9,6) sont déposés dans chaque puits d'une plaque ELISA, à l'exception de deux puits qui permettront de faire un blanc. Après une nuit d'incubation à 4°C en chambre humide, la plaque est lavée trois fois avec du tampon PBS-Tween (PBS 1X, Tween 20® 0,1%) puis saturée avec 200 µL par puits d'une solution de lait (*powdered milk*, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Allemagne) diluée à 3% dans du PBS 1X. La plaque est incubée pendant deux heures à température ambiante. Le pool CRYOcheck® Pooled Normal Plasma (Cryopep, Montpellier, France) est utilisé comme calibrant avec une concentration d'antigène d'ADAMTS13 de l'ordre de 1 µg/mL. Ce pool est dilué au 1/25<sup>ème</sup> dans le tampon de dilution (solution de lait diluée à 0,3%). Un CIQ de niveau bas (patient PTT en phase aiguë, antigène = 0,3 µg/mL) est ajouté à chaque plaque. Les échantillons de plasma sont dilués en tampon de dilution en fonction de l'activité d'ADAMTS13 (dilution au 1/100<sup>ème</sup> pour une activité d'ADAMTS13 >50 UI/dL, dilution au 1/25<sup>ème</sup> si activité comprise entre 10 et 50 UI/dL, dilution au 1/12,5<sup>ème</sup> si activité <10 UI/dL). La plaque est lavée trois fois avec le tampon PBS-T, puis 250 µL de pool, de CIQ et de plasmas à tester préalablement dilués sont déposés dans chaque puits de la plaque. Des dilutions successives dans du lait à 0,3% sont réalisées en plaque (en six points pour la gamme d'étalonnage et en quatre points pour chaque échantillon), avec un volume final de 100 µL par puits. Après une heure d'incubation à 37°C en chambre humide, la plaque est lavée trois fois et 100 µL d'une solution contenant les anticorps murins anti-hADAMTS13 17G2<sup>342</sup> et 19H4<sup>97</sup> biotinylés à une concentration de 1,5 µg/mL sont déposés dans chaque puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, la plaque est lavée trois fois puis 100 µL de streptavidine-orthophénylène diamine (OPD) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne) diluée au 1/10000<sup>ème</sup> dans du lait 0,3% sont déposés dans chaque puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, la plaque est lavée trois fois puis 160 µL de solution de coloration (OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilué en tampon phosphate/citrate Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O/acide citrique) sont ajoutés dans chaque puits. Après 5 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée par addition de 50 µL d'acide sulfurique 4 M. L'absorbance du milieu réactionnel est lue à 490 nm dans un spectrophotomètre (MULTISKAN FC®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) et chaque point est comparé à la gamme d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en µg/mL. Les valeurs usuelles sont comprises en 0,930 et 1,350 µg/mL d'antigène d'ADAMTS13. La limite de détection est de 0,02 µg/mL<sup>197</sup>.

#### **b) Etude de la conformation d'ADAMTS13 (1C4-ELISA)**

La détermination de la conformation ouverte ou fermée d'ADAMTS13 est réalisée par une méthode immuno-enzymatique de type ELISA développée par Roose et al. en 2018<sup>197</sup> dont le principe consiste



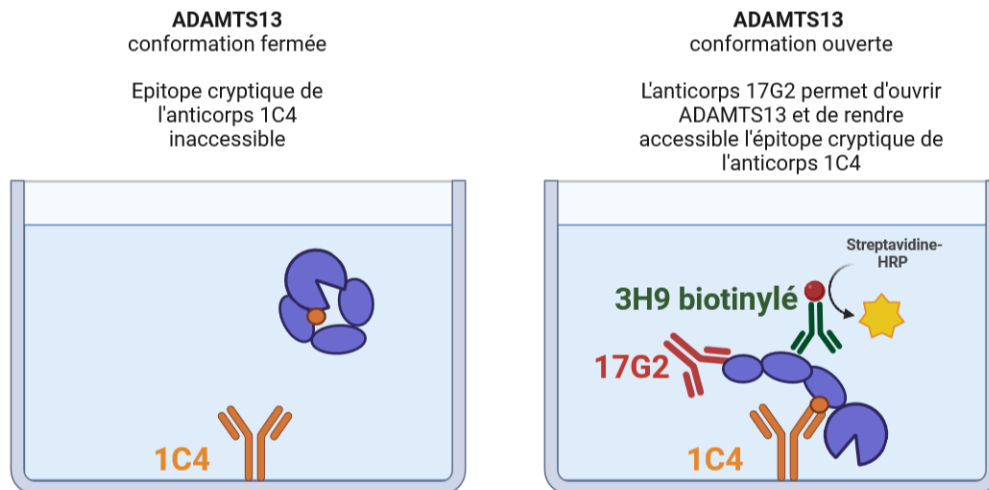
à mesurer la capacité de l'anticorps murin anti-hADAMTS13 1C4 à fixer son épitope, un site cryptique du domaine *spacer* accessible lorsque la conformation d'ADAMTS13 est ouverte. Cette liaison est mesurée en l'absence et en présence de l'anticorps murin anti-hADAMTS13 17G2 capable d'induire l'ouverture d'ADAMTS13 *in vitro* en mimant la liaison d'ADAMTS13 au domaine D4CK du VWF<sup>342</sup>. Cette méthode nécessite toutefois une concentration minimale d'antigène d'ADAMTS13 de 0,03 µg/mL préalablement déterminée par le 3H9-ELISA. Les épitopes des anticorps anti-ADAMTS13 1C4 et 17G2 sont présentés dans la **Figure 24**.



**Figure 24. Epitopes des anticorps anti-ADAMTS13 1C4 et 17G2**

Cent µL d'une solution d'anticorps 1C4 dilués à 5 µg/mL dans du tampon carbonate/bicarbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  0,05 M, pH 9,6) sont déposés dans chaque puits d'une plaque ELISA. Après une nuit d'incubation à 4°C en chambre humide, la plaque est lavée trois fois avec du tampon PBS-Tween (PBS 1X, Tween 20® 0,1%) puis saturée avec 200 µL d'une solution de lait dilué à 3% dans du PBS 1X dans chaque puits. La plaque est incubée pendant deux heures à température ambiante. Le pool CRYOcheck Pooled Normal Plasma® (Cryopep, Montpellier, France) est utilisé comme calibrant avec une concentration d'antigène d'ADAMTS13 de l'ordre de 1 µg/mL. Chaque plaque comprend trois CIQ : le pool normal et deux plasmas de patients PTTi connus (CIQ1 : antigène d'ADAMTS13 indétectable, CIQ2 : antigène > à 0,03 µg/mL et conformation connue ouverte<sup>197</sup>). A l'état basal, la conformation d'ADAMTS13 est fermée (l'épitope de l'anticorps 1C4 est cryptique) et après l'ajout de l'anticorps murin anti-hADAMTS13 17G2, elle devient ouverte (l'épitope de l'anticorps 1C4 est accessible). Les échantillons et le pool sont dilués au ½ en tampon de dilution (solution de lait 0,3% en PBS 1X) avec et sans anticorps 17G2 (30 µL à 2,5 µg/mL), puis déposés dans une plaque de dilution. Des dilutions sériées au ½ (en six points pour la gamme d'étalonnage et en quatre points pour chaque échantillon) sont réalisées. La plaque de dilution est incubée à 37°C en chambre humide pendant 30 minutes. Après trois lavages en tampon PBS-T de la plaque couverte d'anticorps 1C4, 50 µL de pool et d'échantillons préalablement dilués en plaque sont déposés dans chaque puits avant une heure d'incubation à 37°C en chambre humide pendant une heure. Après trois lavages, 100 µL d'anticorps murin anti-hADAMTS13 3H9 biotinyllé dilués dans du lait 0,3% (concentration finale 1,5 µg/mL) sont déposés dans chaque puits et incubés pendant une heure à température ambiante. Après trois lavages, 100 µL de conjugué

streptavidine-HRP (Thermo Fischer Scientific®, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) dilué au 1/10000<sup>ème</sup> dans le tampon de lait 0,3% sont déposés dans chaque puits et incubés une heure à température ambiante. Après trois lavages, 160 µL de solution de coloration (OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilué en tampon phosphate/citrate Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O/acide citrique) sont ajoutés dans chaque puits. Après 5 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée par ajout de 50 µL d'acide sulfurique 4 M. L'absorbance du milieu réactionnel est lue à 490 nm dans un spectrophotomètre (MULTISKAN FC®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) et chaque point est comparé à la gamme d'étalonnage. La **Figure 25** schématise la détermination de la conformation d'ADAMTS13.



**Figure 25. Détermination de la conformation d'ADAMTS13 par 1C4 ELISA**

### c) Calcul de l'index de conformation

L'absorbance lue à 490 nm avec le 1C4-ELISA est standardisée par rapport à la concentration d'antigène obtenue avec le 3H9-ELISA pour chaque échantillon :  $DO_{490nm,Ag} = DO_{490nm} / ADAMTS13:Ag$ . Enfin, la  $DO_{490nm,Ag}$  d'une dilution encadrée par la gamme d'étalonnage (le plus souvent au 1/4) est normalisée par la  $DO_{490nm}$  du pool à la même dilution. Les résultats sont ainsi exprimés en index de conformation (IC) comparables entre plusieurs séries de mesures :

$$IC = [DO_{490nm} \text{ plasma testé à la dilution } d / ADAMTS13:Ag \text{ plasma testé à la dilution } d] / DO_{490nm} \text{ pool à la dilution } d$$

La conformation d'ADAMTS13 est considérée ouverte si l'IC est supérieur à 0,5.

## 4. Recherche de facteurs de risque génétiques dans le PTT

Comme exigé par la législation en vigueur en vue d'analyse de génétique moléculaire constitutionnelle, le consentement éclairé et signé de tous les patients est préalablement requis.

### a) Extraction d'ADN

L'ADN de chaque patient a été extrait et purifié à partir de 2 mL de sang total avec le kit QIASymphony® DSP DNA Midi kit, sur l'automate QIASymphony® SP (QIAGEN, Hilden, Allemagne) selon les

recommandations du fournisseur. La concentration en ADN de chaque échantillon a été vérifiée par spectrophotométrie à 260 nm.

## b) Séquençage de l'exon 24 du gène *ADAMTS13*

### Choix et préparation des amorces

La séquence des amorces utilisées afin d'amplifier l'exon 24 du gène codant pour la protéine ADAMTS13 est 5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-ATG-AGC-CAA-TGC-CTC-CTA-GA-3' (Eurogentec, Liège, Belgique). Vingt µL de solution d'amorces sens ou antisens sont dilués dans 180 µL d'eau distillée.

### Amplification par PCR

Les PCR sont effectuées sur plaque 96 puits. Pour chaque échantillon, 2 µL d'ADN sont ajoutés à 25 µL de GoTag Master Mix®, 20 µL de Nuclease Free Water® (Promega, Madison, Wisconsin, Etats-Unis), 2 µL d'amorces sens et 2 µL d'amorces antisens, pour un volume total de 51 µL. Un blanc PCR, dépourvu d'ADN, est également présent dans la plaque. La réaction d'amplification est effectuée dans un thermocycleur UNO peqSTAR 96X® (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Le protocole d'amplification est décrit dans le **Tableau 5**.

**Tableau 5. Protocole d'amplification de l'ADN de l'exon 24 du gène *ADAMTS13***

| Nombre de cycles | Température | Durée       | Remarque   |
|------------------|-------------|-------------|--|
| 1 cycle          | 94°C        | 2 minutes   |  |
| 13 cycles        | 94°C        | 15 secondes | Dénaturation de l'ADN  |
|                  | 68°C → 55°C | 15 secondes | Hybridation des amorces<br>La température est diminuée d'un degré à chaque cycle, jusqu'à 55°C au cours du dernier cycle |
|                  | 72°C        | 30 secondes | Polymérisation de l'ADN  |
| 24 cycles        | 94°C        | 15 secondes | Dénaturation de l'ADN  |
|                  | 50°C        | 15 secondes | Hybridation des amorces  |
|                  | 72°C        | 30 secondes | Polymérisation de l'ADN  |
| 1 cycle          | 72°C        | 2 minutes   |  |

### Vérification sur gel d'agarose

Les produits de PCR sont contrôlés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%, préparé avec 1g d'agarose SeaKem® (Lonza, Bâle, Suisse) et 50 mL de tampon Tris Borate EDTA (TBE) 1X (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Un marqueur de poids moléculaire O'ANGE RULER 50 BP® (Life Technologies, Carlsbad, Californie, Etats-Unis) est utilisé. Huit µL de chaque produit de PCR (blanc de PCR compris) sont mélangés à 2 µL de bleu de bromophénol avant d'être déposés dans un puits du gel pour une électrophorèse à 50 Volt pendant 30 minutes. Le gel est ensuite coloré pendant

15 minutes dans une solution de Gel Red® (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France), puis rincé à l'eau distillée avant d'être posé sur une plaque à ultra-violet pour visualisation et acquisition des bandes.

### ***Purification des produits de PCR***

La purification des produits de PCR est effectuée sur des microplaques NucleoFast® 96PCR (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Aux 43 µL de chaque produit de PCR restant (après retrait de 8 µL pour vérification sur gel) sont ajoutés 77 µL d'eau distillée pour obtenir un volume total de 120 µL. Chaque échantillon ainsi dilué est déposé sur la plaque, protégée par du film adhésif et posée sur un système d'aspiration branché à -20 inHg pendant 7 minutes. Après élimination de l'excédent d'eau au-dessous de la plaque, les produits de PCR ainsi purifiés sont élués dans 50 µL d'eau distillée et la microplaque est agitée sur un agitateur à microplaques pendant 10 minutes à 600 tours/minute. Les produits de PCR purifiés sont transvasés dans une microplaque standard.

### ***Réactions de séquence***

Les réactions de séquence sont effectuées sur une plaque 96 puits. A 2 µL de chaque échantillon purifié élué sont ajoutés 12,5 µL d'eau distillée, 3,5 µL de tampon 5X, 1 µL de BigDye Terminator v3.1® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) et 1 µL d'amorces diluées (sens ou antisens). La réaction de séquence est effectuée dans un thermocycleur UNO peqSTAR 96X® (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) pour la réaction de séquence. Le protocole de la réaction de séquence est décrit dans le **Tableau 6**.

**Tableau 6. Protocole de la réaction de séquence de l'exon 24 du gène ADAMTS13**

| <b>Nombre de cycles</b> | <b>Température</b> | <b>Durée</b> | <b>Remarque</b>                                    |
|-------------------------|--------------------|--------------|--|
| 1 cycle                 | 96°C               | 5 minutes    |  |
| 26 cycles               | 98°C               | 10 secondes  | Dénaturation de l'ADN                              |
|                         | 54°C               | 4 minutes    | Hybridation des amorces<br>Polymérisation de l'ADN |

### ***Purification des produits de réactions de séquence***

La purification des produits de réactions de séquence est effectuée sur gel SEPHADEX G50® (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, Etats-Unis) sur plaque Multiscreen® (Merck Millipore, Guyancourt, France). La plaque est centrifugée pendant 5 minutes à 2500 tours/minute à 15°C. L'excédent d'eau de la plaque est rejeté et 150 µL d'eau distillée sont ajoutés à chaque puits avant une nouvelle centrifugation dans des conditions identiques. Les échantillons des réactions de séquence sont déposés dans les puits, et une plaque destinée au séquençage dont chaque puits a préalablement été rempli avec 10 µL d'eau distillée est placée en dessous de la plaque de purification. L'ensemble est centrifugé dans les mêmes conditions, et la plaque destinée au séquençage est récupérée.

### **Séquençage**

Le séquençage est effectué par l'automate 3130 Genetic Analyzer 16-capillary® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis), par la méthode de Sanger. La séquence est analysée sur le logiciel fournisseur (Sequencing Analysis® Software v7.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).

#### **c) Séquençage haut débit des gènes *VWF*, *F8*, *ADAMTS13*, *GP1BA*, *ITGA2B*, *ITGB3***

L'étude du gène *ADAMTS13* réalisée dans le cadre des soins pour le diagnostic de PTTc est effectuée dans le service de génétique moléculaire du CHU de Nantes (Dr Pierre Boisseau, Pr Stéphane Bézieau). Le séquençage haut débit par la technologie IDT (*Integrated DNA technologies*) est réalisé sur le séquenceur Illumina MiSeq couvrant la séquence codante, les jonctions introns-exons, le promoteur et les régions 5' et 3' du gène *ADAMTS13*. L'analyse bio-informatique est réalisée avec l'algorithme développé par Sophia Genetics® et permet de détecter les variants ponctuels et les grands réarrangements. La confirmation des variations de séquence délétères mises en évidence est effectuée par le séquençage automatique double brin.

L'étude des gènes *VWF*, *F8*, *GP1BA*, *ITGA2B* et *ITGB3* dans le cadre de ce projet de recherche a été faite en collaboration avec le Dr Pierre Boisseau qui a réalisé dans un premier temps le séquençage haut-débit dans les mêmes conditions techniques. L'analyse des données a été effectuée dans un second temps dans l'unité fonctionnelle de génétique moléculaire de l'Hôpital Lariboisière avec la collaboration du Pr Corinne Collet (service de biochimie et biologie moléculaire, Pr Jean-Louis Laplanche). L'analyse bio-informatique a été réalisée avec le logiciel SeqPilot 5.1.0. (JSI medical systems®) et permet de détecter les substitutions nucléotidiques, les insertions/délétions et les grands réarrangements. Les variants identifiés non retrouvés ou dont la fréquence allélique est inférieure à 15% dans les bases de données dbSNP, 1000 Genomes, ClinVar et gnomAD ont été analysés sur les logiciels Alamut®, Poly-Phen-2® et SIFT® pour prédire leur caractère délétère. La nomenclature utilisée respecte les règles du *Human Genome Variation Society* (HGVS).

Les transcrits des gènes étudiés sont présentés dans le Tableau 7.

**Tableau 7. Transcrits des gènes *VWF*, *F8*, *ADAMTS13*, *GP1BA*, *ITGA2B* et *ITGB3***

| <b>Gène</b>     | <b>Transcrit (mARN) étudié</b> |
|-----------------|--------------------------------|
| <i>VWF</i>      | NM_000552.4                    |
| <i>F8</i>       | NM_000132.3                    |
| <i>ADAMTS13</i> | NM_139025.4                    |
| <i>GP1BA</i>    | NM_000173.6                    |
| <i>ITGA2B</i>   | NM_000419.4                    |
| <i>ITGB3</i>    | NM_000212.2                    |

## **5. Analyse statistique.**

L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel GraphPad Prism® version 7.00 (chapitres 1 et 2) puis version 8.6.3 (chapitres 3 et 4) (GraphPad Software, La Jolla, Californie, Etats-Unis). Les régressions linéaires ont été effectuées par la formule de Pearson. Les variables quantitatives sont présentées sous la forme de médiane et d'intervalles inter-quartiles et ont été comparées par un test non paramétrique de Mann-Whitney. Les variables quantitatives sont présentées en nombre de patients et de pourcentage et ont été comparées par un test exact de Fisher. Le risque de première espèce est fixé à 5%. Les spécificités de l'étude statistique de chaque sous-partie seront précisées dans chaque chapitre.

# RESULTATS

## I. Evaluation et développement de nouvelles méthodes d'exploration biologique du facteur Willebrand et d'ADAMTS13

### 1. Etude de la répartition des multimères du facteur Willebrand et de la liaison du facteur Willebrand au collagène à la phase aiguë du purpura thrombotique thrombocytopénique acquis

#### Première publication

Thromb Res. 2019 Sep;181:29-35.doi: 10.1016/j.thromres.2019.07.012.

#### **Loss of von Willebrand factor high-molecular-weight multimers at acute phase is associated with detectable anti-ADAMTS13 IgG and neurological symptoms in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura**

Nicolas Beranger<sup>1,2</sup>, Sandrine Benghezal<sup>1,2</sup>, Sylvaine Savigny<sup>1,2</sup>, Sophie Capdenat<sup>1,2</sup>, Bérangère S. Joly<sup>1,2</sup>, Paul Coppo<sup>2,3</sup>, Alain Stepanian<sup>1,2</sup>, Agnès Veyradier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Service d'hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, AP-HP.Nord and EA3518, Institut de Recherche Saint-Louis, Université Paris Cité, Paris, France

<sup>2</sup> French National Reference Centre for Thrombotic Microangiopathies, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, France

<sup>3</sup> Département d'hématologie clinique, Hôpital Saint Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

En 1982, Moake et al. ont publié une étude déterminante pour la compréhension de la physiopathologie du PTT en mettant en évidence un excès de VWF-THPM dans le plasma des patients atteints de PTT<sup>65</sup>. Cette preuve de concept a permis de suspecter l'existence d'une régulation de la taille des multimères du VWF par une protéase et *in fine* de découvrir ADAMTS13. Malgré cette publication déterminante, la complexité technique de l'analyse des multimères du VWF par une méthode électrophorétique a limité leur étude dans le PTT. En 2001, Veyradier et al. ont complété cette analyse en montrant que les profils de distribution des multimères du VWF pouvaient être très hétérogènes chez les patients atteints de PTT<sup>118</sup>. L'électrophorèse sur gel SDS-agarose est une méthode de séparation physique des multimères de VWF et demeure la technique de référence. Le développement d'une méthode commerciale d'électrophorèse semi-automatisée pour l'étude des multimères du VWF lève une partie des contraintes techniques liées à la technique de référence en gel de SDS-agarose. La capacité de liaison du VWF au collagène (test chromogénique VWF:CB) est une mesure fonctionnelle du VWF qui dépend intimement de son degré de multimérisation et dont l'intérêt à diagnostiquer une perte des VWF-HPM a été validé dans la maladie de Willebrand. En revanche, le VWF:CB n'a jamais été évalué pour détecter un excès de multimérisation du VWF. En confrontant une méthode électrophorétique semi-automatisée au VWF:CB ELISA, nous avons voulu documenter de manière plus précise la multimérisation du VWF à la phase aiguë du PTT.

Dans le premier volet de ce chapitre méthodologique, 114 patients adultes atteints de PTT acquis en phase aiguë (activité d'ADAMTS13 mesurée par FRETS-VWF73 < 10 UI/dL) ont été inclus à partir du PHRC « Facteurs pronostiques dépendants d'ADAMTS13 dans le purpura thrombotique thrombocytopénique » (matricule DRCD AOM05012/P051064) dont les critères d'inclusion ont été précisés précédemment. Les critères d'exclusion sont les suivants : néoplasie active, transplantation d'organe, infection par le VIH. Neuf échantillons de patients atteints de PTTc, et donc présentant un excès de VWF-THPM à distance de tout traitement prophylactique par plasma, et six échantillons de patients atteints de VWD (caractérisés et génotypés dans le cadre des soins) ont été utilisés comme CIQ et pour l'étude des performances analytiques de ces deux méthodes. Une mesure de VWF:Ag (ASSERACHROM® VWF:Ag, Stago, Asnières-sur-Seine, France), de VWF:CB (ASSERACHROM® VWF:CB, Stago, Asnières-sur-Seine, France) et une électrophorèse des multimères du VWF (système semi-automatique HYDRASIS 2®, gel d'agarose HYDRAGEL von WILLEBRAND MULTIMERS®, Sebia, Lisses, France) ont été réalisés pour chaque patient. Le taux de VWF-HPM et le VWF:CB ont été comparés à la présentation clinico-biologique des 114 PTT acquis en phase aiguë.

Les caractéristiques démographiques, cliniques et biologiques des patients de cette cohorte sont concordantes avec celles décrites à l'échelle nationale<sup>131</sup>. Les patients sont majoritairement des femmes (77F/37H, 67,5%) et l'âge médian de survenue du PTT est de 35,5 ans. La présentation du PTT est principalement idiopathique (80/114, 70,2%). Les contextes cliniques rapportés parmi les PTT secondaires sont la présence d'une maladie auto-immune (17/114, 14,9%), d'une infection hors VIH (9/114, 7,9%), d'une grossesse (6/55 femmes âgées de 15 à 45 ans, 10,9%) ou une prise de médicament/toxique (2/114, 2,6% ; interféron  $\beta$ , cocaïne). Enfin, des IgG anti-ADAMTS13 sont positives à un titre significatif chez 95 patients (95/114, 84,8%), confirmant le diagnostic de PTTi. L'exploration biologique retrouve une anémie hémolytique mécanique (89,7%) et une thrombopénie inférieure à 50



G/L (88,9%). Une faible majorité des patients (59,6%) présentent une symptomatologie neurologique mineure (céphalées, confusion) ou majeure (convulsions, coma ou ischémie cérébrale constituée). La créatininémie médiane est de 114  $\mu\text{mol/L}$  (minimum : 66  $\mu\text{mol/L}$  ; maximum : 312  $\mu\text{mol/L}$ ).

Les VWF-BPM correspondent aux cinq premières bandes visibles à l'opposé du dépôt, les cinq bandes suivantes correspondent aux VWF-PMI, et enfin les VWF-HPM sont situés à partir de la 11<sup>ème</sup> bande. L'électrophorèse des multimères du VWF par un système semi-automatique offre une moins bonne résolution par rapport à la méthode de référence historique car elle ne permet pas d'individualiser clairement les bandes au-delà de la 8<sup>ème</sup> bande chez les sujets sains (3 pools différents de volontaires sains testés pour la première phase de mise au point). Un pool de sérum normal est utilisé comme référence. Le pourcentage moyen de VWF-HPM est de 37,3% (écart-type : 5,6%), déterminé à partir de 24 séries réalisées sur du pool normal (VWF:Ag de l'ordre de 100 UI/dL). Pour notre étude ciblée sur les VWF-HPM des patients PTT, nous avons donc décidé de définir la fraction VWF-HPM à partir de la 8<sup>ème</sup> bande. L'étude des performances analytiques de la méthode a été réalisée à l'aide de sérums de patients PTT caractérisés dans le cadre des soins.

L'étude de la multimérisation du VWF dans le PTTc a montré que le taux médian de VWF-HPM déterminé par électrophorèse est de 57,4 UI/dL (n=9, minimum : 34,5 UI/dL ; maximum 71,7 UI/dL) donc augmenté significativement par rapport au pool ( $p < 10^{-4}$ ) et le VWF:CB médian est de 116% (n=9, minimum : 0,74 ; maximum : 1,40). Une augmentation des VWF-HPM est donc globalement retrouvée comme attendu dans le PTTc, quel que soit le mode d'évaluation, ce qui confirme la capacité des deux méthodes (électrophorèse semi-automatisée sur gel d'agarose et VWF:CB) à détecter et quantifier un excès de VWF-HPM.

Chez les 114 patients atteints de PTT acquis, la répartition multimérique du VWF est très hétérogène avec cependant de façon surprenante une perte de VWF-HPM chez environ la moitié des patients, quelle que soit la technique. Par électrophorèse sur gel, le taux médian de VWF-HPM est de 36,9 UI/dL (minimum : 3,2 UI/dL ; maximum : 206,8 UI/dL) et une perte de VWF-HPM ( $< 37,3$  UI/dL) est objectivée chez la moitié des patients (57/114, 50%). Le VWF:CB médian est de 74% (minimum : 7% ; maximum 299%) et 54 patients (54/114, 47,4%) ont un VWF:CB inférieur à 70%, indiquant une perte relative plus ou moins marquée de VWF-HPM. Le VWF:CB est globalement bien corrélé au profil multimérique du VWF estimé par électrophorèse semi-automatisée. La confrontation clinico-biologique montre une association entre la perte de VWF-HPM (soit un VWF:CB  $< 70\%$  soit un taux de VWF-HPM  $< 37,3$  UI/dL) et la présence d'IgG anti-ADAMTS13, la fréquence et la gravité des signes neurologiques ( $p < 0,05$ ). Un VWF:CB inférieur à 70% est également associé à une thrombopénie plus profonde ( $p < 0,05$ ).

Ces résultats, a priori contre-intuitifs, pourraient être expliqués par la consommation et la séquestration des VWF-HPM et des plaquettes dans les microthrombi, conduisant à leur absence apparente dans le compartiment sanguin circulant. L'histoire naturelle du PTT semblerait donc faire succéder une accumulation de VWF-HPM à un déficit fonctionnel en ADAMTS13, qui évoluerait en perte de VWF-HPM au profit de la formation des microthrombi et de l'apparition de signes neurologiques. La cinétique de ce processus reste toutefois inconnue, mais pourrait être différente selon l'étiologie (auto-immune ou non) du déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13.



## Full Length Article

# Loss of von Willebrand factor high-molecular-weight multimers at acute phase is associated with detectable anti-ADAMTS13 IgG and neurological symptoms in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura



Nicolas Béranger<sup>a,b</sup>, Sandrine Benghezal<sup>a,b</sup>, Sylvaine Savigny<sup>a,b</sup>, Sophie Capdenat<sup>a,b</sup>,  
Bérangère S. Joly<sup>a,b</sup>, Paul Coppo<sup>c,d</sup>, Alain Stepanian<sup>a,b</sup>, Agnès Veyradier<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>b</sup> EA3518, Institut Universitaire d'Hématologie Saint Louis, Université Paris Diderot, Paris, France

<sup>c</sup> Service d'Hématologie, Centre National de référence des MicroAngiopathies Thrombotiques, Hôpital Saint-Antoine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>d</sup> Sorbonne Universités, Université Paris 6, Paris, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Thrombotic thrombocytopenic purpura  
ADAMTS13  
von Willebrand factor  
Multimer  
Collagen

## ABSTRACT

**Introduction:** Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a rare life threatening thrombotic microangiopathy caused by a severe functional deficiency of ADAMTS13, most frequently due to autoantibodies to ADAMTS13, thus termed acquired autoimmune TTP. ADAMTS13 specifically regulates the adhesive activity of von Willebrand factor (VWF) by cleaving its high-molecular-weight multimers (HMWM). We investigated whether VWF-HMWM level at acute phase of TTP could be a predictive factor for morbidity.

**Material and methods:** We gathered clinical and biological data from a cohort of 114 patients with acquired TTP at acute phase. VWF-HMWM were assessed by electrophoretic analysis and by an ELISA measuring the capacity of VWF to bind to collagen (VWF:CB), and linear correlation between these two methods was carried out. We cross-referenced clinical and biological data with VWF-HMWM levels.

**Results:** VWF-HMWM levels were heterogeneous, but half of our patients were below normal range (50% if assessed by electrophoresis; 47.4% if assessed by ELISA). The correlation study between electrophoresis and ELISA reached statistical significance ( $r^2 = 0.5979$ ;  $p < 0.0001$ ). Statistical analysis showed that loss of VWF-HMWM as assessed by VWF:CB  $< 70$  IU/dL is associated with detectable anti-ADAMTS13 antibodies, severe neurological symptoms and thrombocytopenia ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Our results confirm that VWF-HMWM can be satisfactorily assessed by VWF:CB, much easier to perform than electrophoresis. The association highlighted between loss of VWF-HMWM, detectable anti-ADAMTS13 IgG and neurological symptoms may offer new insights to understanding the pathophysiology of acquired auto-immune TTP.

## 1. Introduction

Thrombotic microangiopathies (TMA) are rare, life threatening diseases defined by the association of mechanical hemolytic anemia with erythrocyte fragmentation, consumption thrombocytopenia and organ failure of variable severity. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a form of TMA specifically caused by a severe functional deficiency of ADAMTS13 (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type 1 repeats, member 13), the specific von Willebrand factor (VWF)-cleaving protease [1]. At the acute phase of TTP, the severe functional deficiency of ADAMTS13 activity (below

10% of normal) leads to the accumulation of ultralarge hyper-adhesive VWF multimers in plasma, which spontaneously bind to platelets, hence consumption thrombocytopenia, and form VWF-rich platelet microthrombi on the surface of which red blood cells are fractured into schistocytes [2]. These microthrombi obstruct blood flow in the microcirculation, thus causing multivisceral ischemia. After effective therapy, the ischemia symptoms and the bicytopenia disappear, defining remission phase, during which patients still require periodic blood cell count and ADAMTS13 activity monitoring to predict any relapse [3]. TTP is an acquired disease in most cases and can also be hereditary in a few cases, due to recessively inherited mutations of the

\* Corresponding author at: Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 2 rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France.

E-mail address: [agnes.veyradier@aphp.fr](mailto:agnes.veyradier@aphp.fr) (A. Veyradier).

<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.07.012>

Received 17 March 2019; Received in revised form 22 June 2019; Accepted 14 July 2019

Available online 16 July 2019

0049-3848/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.



ADAMTS13 gene (Upshaw-Schulman Syndrome, USS) [4]. TTP is termed acquired autoimmune when due to autoantibodies against ADAMTS13 [5].

Acquired TTP is a medical emergency requiring rapid management. Frequent clinical features include fever, neurological symptoms (such as headache, confusion, convulsions, coma or brain ischemia) and cardiac ischemia, but clinical presentation is widely heterogeneous and TTP diagnosis can be challenging [6,7].

Finding new parameters that could explain the variability of clinical presentation at acute phase of TTP could be useful, either as part of new diagnosis algorithms or as prognostic tools. In this study, we focused on VWF multimeric analysis and hypothesize that clinical or biological features exhibited at acute phase of TTP could partially depend on VWF-HMWM levels. VWF-HMWM are known to be the most adhesive platelet-binding fraction of all VWF multimers, and they are crucial to maintain functionality of VWF [8]. This is highlighted in von Willebrand Disease (VWD) type 2A, a subtype of VWD characterized by decreased VWF-dependent platelet adhesion due to selective loss of VWF-HMWM usually resulting from an increased sensitivity to cleavage by ADAMTS13 [9]. VWF multimeric analysis is usually performed using electrophoresis as the reference method, and it can be helpful to diagnose VWD2A. However, electrophoresis is time consuming and technical to carry out [10]. Rather than this complex in-house method, we chose to assess HMWM through two approaches: i) semi-automated electrophoresis using SDS-agarose gel and immunochemical revelation and ii) ELISA method based on the capacity of VWF to bind to human type III collagen (VWF:CB) as VWF:CB not only assesses the integrity of VWF collagen binding domains (A1 and A3) but also shows preferential binding to VWF-HMWM [11].

While TTP is characterized by an excess of ultralarge hyperadhesive VWF-HMWM, a previous study showed that plasma VWF multimeric analysis in TTP patients at acute phase was very heterogeneous [12], with roughly a third each of selective loss, excess or normal fraction of VWF-HMWM and no apparent connection to clinical or biological features. Moreover, VWF antigen (VWF:Ag) levels are usually high but vary greatly amongst TTP patients, probably in accordance with the level of endothelial lesion.

In this study, we chose to rely on VWF-HMWM levels (expressed in IU/dL), as the product of HMWM fraction assessed by electrophoresis and VWF:Ag levels, and look into whether a specific apparent decreased VWF-HMWM level could be associated with higher morbidity. To support that hypothesis, we also performed VWF:CB as the reflect of VWF-HMWM levels and cross-referenced both parameters to clinical and biological data gathered from a cohort of 114 TTP patients.

## 2. Material and methods

### 2.1. Patients

Since 2000, all patients in France with a presumptive diagnosis of TMA (defined as the presence of microangiopathic hemolytic anemia with hemoglobin level < 12 g/dL with or without presence of schistocytes, and thrombocytopenia <  $150 \times 10^9/L$  with or without ischaemic manifestations) have been enrolled in the registry of the National Reference Center for TMA (Health Ministry National Plan for Rare Diseases) and have been investigated for ADAMTS13 by the French reference laboratory for TMA.

We studied 114 patients (109 adults and 5 children, 4 < 15 years old and 1 > 15 years old) with well documented acquired TTP at acute phase prospectively enrolled from 2006 to 2010 as part of a clinical research program. Nine patients with USS at remission phase, thus presenting a constant excess of VWF-HMWM through genetic deficiency of ADAMTS13 were used as controls. Inclusion criteria comprise clinical diagnosis of TTP, severe deficiency of ADAMTS13 activity (< 10%), hemoglobin level < 10 g/dL and/or platelet count <  $150 \times 10^9/L$ , while exclusion criteria include cancer, HIV and organ graft. Clinical

and biological data were collected after extensive analysis of medical records, including 8 to 14 years of follow-up (relapse and/or death). Neurological symptoms were particularly looked into: symptoms such as headaches or confusion were considered mild neurological symptoms, while seizures, coma, focal deficiency or two (or more) neurological symptoms were labelled severe. Cerebral ischemia was assessed by clinical presentation and magnetic resonance imaging. Written informed consent was obtained from all patients according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Pitié-Salpêtrière (Paris, France). The study is registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) as number NCT00426686, at the Health Authority and by the French Ministry of Health as number P051064/PHRC AOM05012.

Venous blood was collected at the time of enrollment (acute phase) before any treatment, into 1:10 final volume of 3.8% sodium citrate. A normal pooled plasma (14 healthy volunteers) was used as normal control for all biologic assays.

### 2.2. ADAMTS13 activity assay

ADAMTS13 activity was assessed using the method of Kokame et al. [13] using commercial recombinant FRETTS-VWF73 peptide (Peptide Institute, Osaka, Japan) according to the manufacturer's instructions. Normal range is between 50% and 150%.

### 2.3. VWF:Ag measurement

Plasma VWF:Ag was measured using the ASSERACHROM® VWF:Ag ELISA kit (Stago, Asnières-sur-Seine, France) according to the manufacturer's instructions. The normal range is 50 IU/dL–150 IU/dL.

### 2.4. Multimeric distribution of VWF

The assessment of multimeric distribution of VWF was carried out using the HYDRAGEL von WILLEBRAND MULTIMERS® agarose gel on the semi-automated system HYDRASIS 2® and using the software PHORESIS version 8.6.3 for densitometry analysis (Sebia, Lisses, France) according to the manufacturer's instructions. High molecular weight multimers are defined as all peaks beyond the 10th peak (10th mer). Given the technical performances of the electrophoretic assay we used, we lowered the cut-off value to the 8th peak and analyzed collectively all peaks beyond as high molecular weight multimers. VWF-HMWM (expressed in IU/dL) were then calculated as the product of VWF:Ag and HMWM percentage. The mean HMWM fraction was validated from 24 assessments of a normal pool carried out over 20 electrophoretic assays.

### 2.5. VWF:CB measurement

Plasma VWF:CB measurement was assessed using the ASSERACHROM® VWF:CB ELISA kit (Stago, Asnières-sur-Seine, France) according to the manufacturer's instructions. The normal range, as stated by the French National Reference Center for von Willebrand Disease, is 70 IU/dL–100 IU/dL [10].

### 2.6. Statistical analysis

Categorical variables were compared with  $\chi^2$  or Fisher's exact tests as appropriate. Continuous variables were compared with the non-parametric Mann-Whitney *U* test. Linear regression was performed using Pearson's formula. All tests were two-sided and statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, United States).



**Table 1**

Demographic, clinical and biological characteristics of the cohort of 114 patients with acquired TTP.

| Continuous variables               | 114 patients                         |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Age (years)*                       | 35.5 (1.5–71.3)                      |
| Sex                                | 77 females–37 males; sex ratio 2F/1M |
| Hemoglobin level (g/dL)            | 7.8 (3.2–15.8)                       |
| Platelet count ( $\times 10^9/L$ ) | 15 (2–251)                           |
| LDH (U/L)                          | 2028 (269–8358)                      |
| Non-continuous variables           | N patients/total (%)                 |
| Idiopathic TTP                     | 80/114 (70.2%)                       |
| Non-idiopathic TTP                 | 34/114 (29.8%)                       |
| Autoimmune disease                 | 17/114 (14.9%)                       |
| Infection                          | 9/114 (7.9%)                         |
| Pregnancy**                        | 6/55 (10.9%)                         |
| Drugs***                           | 2/114 (1.7%)                         |
| Positive anti-ADAMTS13 IgG         | 95/112 (84.8%)                       |
| Schistocytes                       | 96/107 (89.7%)                       |
| Neurological disorders             | 65/109 (59.6%)                       |
| Headache                           | 37/109 (33.9%)                       |
| Confusion                          | 22/109 (20.2%)                       |
| Seizure                            | 2/109 (1.8%)                         |
| Coma                               | 7/109 (6.4%)                         |
| Focal deficiency                   | 8/109 (7.3%)                         |
| Proteinuria                        | 23/109 (21.1%)                       |
| Hemoglobinuria                     | 16/109 (14.7%)                       |
| At least one relapse               | 31/114 (27.2%)                       |
| TTP related death                  | 1/114 (0.9%)                         |

Continuous variables data are presented as median (min–max); categorical variables are presented as n/number of patients where data was available, and percentage. LDH: lactate dehydrogenase. TTP: thrombotic thrombocytopenic purpura. ADAMTS13: a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13.

\* One hundred and nine adults and 5 children (4 < 15 years old and 1 > 15 years old).

\*\* Fifty-five women aged 15 to 45.

\*\*\* Two patients had non-idiopathic TTP associated with drugs: interferon-beta (n = 1) and cocaine (n = 1).

### 3. Results

#### 3.1. Characteristics of the cohort at presentation

The demographic, clinical and biological features of our 114 patients with acquired TTP are presented in Table 1. Median age in our cohort was 35.5 years (range 1.5–71.3) with 67.5% of female patients. More than two third of our patients had idiopathic TTP (69.3%) while non-idiopathic TTP (30.7%) were mostly associated with specific clinical contexts such as auto-immune disease (14.9%), non-HIV infection (7.9%) or pregnancy (10.9% of women aged 15 to 45). Clinical presentation was heterogeneous, but neurological abnormalities were present in 59.6% of patients, ranging from minor such as headaches (33.9%) or confusion (20.2%) to severe symptoms like seizure (1.8%), coma (6.4%) or focal deficiency (7.3%), with 10.0% of patients presenting at least two neurological symptoms. Most adult patient did not exhibit renal failure, with median creatinine level at 114  $\mu\text{mol/L}$  (min. 66–max. 312  $\mu\text{mol/L}$ ), however 21.1% of patients had proteinuria and 14.7% hemoglobinuria. Out of the 5 pediatric patients studied, only three records contained creatinine level: two were within normal range for the age of the patient, and only one pediatric patient exhibited high creatinine level (192  $\mu\text{mol/L}$ ). The biological data revealed that a vast majority of patients had detectable anti-ADAMTS13 IgG (84.8%), consistent with auto-immune acquired TTP. Microangiopathic hemolytic anemia and/or thrombocytopenia were found in all patients with median hemoglobin at 7.8 g/dL (min. 3.2–max. 15.8 g/dL) and median platelet count at  $15 \times 10^9/L$  (min. 2–max.  $251 \times 10^9/L$ ). Only 2 patients did not have thrombocytopenia, but both had microangiopathic

**Table 2**

Levels of VWF:Ag and VWF:CB in 123 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) (114 acquired TTP (aTTP) and 9 Upshaw-Schulman Syndrome (USS)).

|                     | VWF:Ag (IU/dL)  |             | VWF:CB (IU/dL)  |             |
|---------------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
|                     | A-TTP (n = 114) | USS (n = 9) | A-TTP (n = 114) | USS (n = 9) |
| Median              | 146             | 100         | 74              | 116         |
| Minimum             | 48              | 56          | 7               | 69          |
| Maximum             | 526             | 174         | 299             | 139         |
| Interquartile range | 122             | 49          | 74              | 24          |

hemolytic anemia. Schistocytes were detected on blood smears in 89.7% of patients. Thirty-one patients (27.2%) had at least one relapse reported during follow-up, and only one patient (0.9%) died of TTP.

#### 3.2. VWF multimeric analysis — VWF:CB

VWF:Ag levels measured in our TTP patients ranged from sub-normal values (min: 48 IU/dL) to frank excess (max: 526 IU/dL) with a median value of 146 IU/dL. The 9 USS patients however showed levels roughly within normal range, with median level measured at 100 IU/dL (range 56–174 IU/dL) (Table 2).

VWF multimeric analysis was performed on normal pooled plasma and mean HMWM fraction was estimated at  $37.3\% \pm 5.6\%$  while VWF:Ag was measured at 100 IU/dL, thus mean VWF-HMWM was assessed at 37.3 IU/dL. We used this value as our cut-off value for the loss of VWF-HMWM. Cut-off value of VWF:CB was fixed at 70 IU/dL, in accordance with the recommendations of the French National Center for von Willebrand Disease [10].

Our TTP patients showed wide heterogeneity, ranging from severe loss to pronounced excess of VWF-HMWM. The median level was 36.9 IU/dL (range 3.2–206.8 IU/dL). Fifty-seven (57/114, 50%) of them showed levels below 37.3 IU/dL. As expected, remission USS patients showed marked excess of VWF-HMWM levels with median level calculated at 57.4 IU/dL (range 34.5–71.7 IU/dL) (Fig. 1).

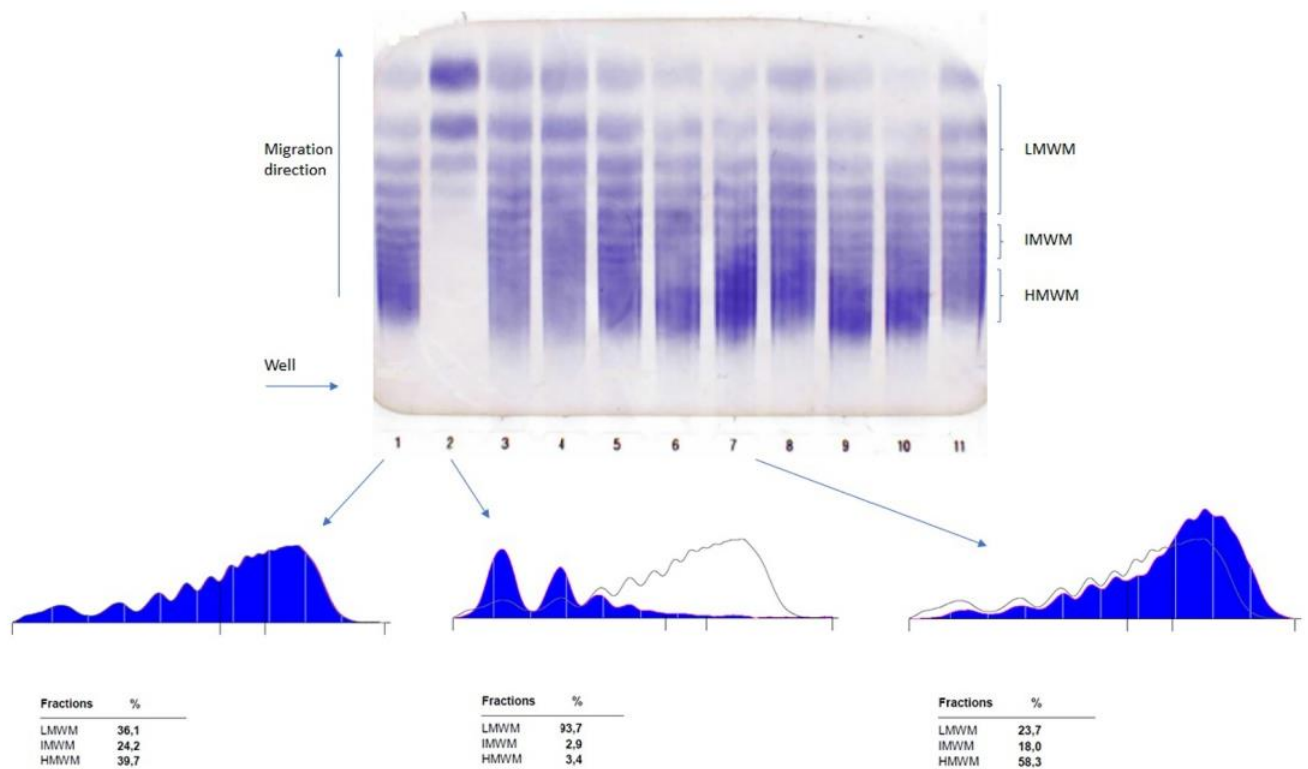
These results are supported by similar findings as to VWF:CB levels: median level in the 114 TTP patients was 74 IU/dL, ranging from 7 IU/dL to 299 IU/dL, and 54 patients (54/114, 47.4%) showed VWF:CB < 70 IU/dL, thus indicating a loss of VWF-HMWM. Median VWF:CB level was 116 IU/dL in the 9 USS patients (range 69 IU/dL–139 IU/dL), indicating an overall excess of VWF-HMWM consistent with the congenital deficiency in ADAMTS13 (Table 2).

Linear correlation performed between VWF-HMWM levels assessed by electrophoresis and VWF:CB measured by ELISA reached statistical significance ( $r^2 = 0.5979$ ,  $p < 0.0001$ ), reinforcing the concept of overlap between those two parameters (Fig. 2).

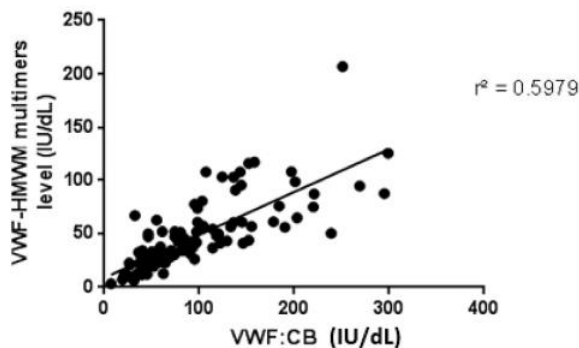
#### 3.3. Clinical comparison

We cross-referenced clinical and biological data from the medical records of the 114 acquired TTP patients, to VWF:CB and VWF-HMWM levels. We considered age, sex, neurological symptoms (defined as mild if comprising headache and/or confusion and severe if the patient exhibit at least one of the following: convulsions, coma, cerebral ischemia), acute kidney failure, hemoglobin level, platelet count, detectable anti-ADAMTS13 IgG and the occurrence of relapse.

VWF:CB cut-off value was set at 70 IU/dL, with 54 TTP patients exhibiting VWF:CB < 70 IU/dL and 60 patients exhibiting VWF:CB > 70 IU/dL. Neurological symptoms were associated with lower VWF:CB ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3). The same association is brought to light when splitting patients into no neurological symptoms, mild neurological symptoms and severe neurological symptoms, the latter



**Fig. 1.** Multimeric distribution of VWF multimers in 8 patients with TTP. LMWM: low molecular weight multimers; IMWM: intermediate molecular weight multimers; HMWM: high molecular weight multimers. Lanes 1 and 11: Normal pooled plasma showing normal VWF multimeric distribution. Lane 2: Patient with von Willebrand disease type 2A used as control for a significant defect of VWF-HMWM. Lanes 3 to 10: Patients with TTP. To show the densitometry analysis, the TTP patient from lane 7, showed as an example, exhibits an excess of VWF-HMWM.



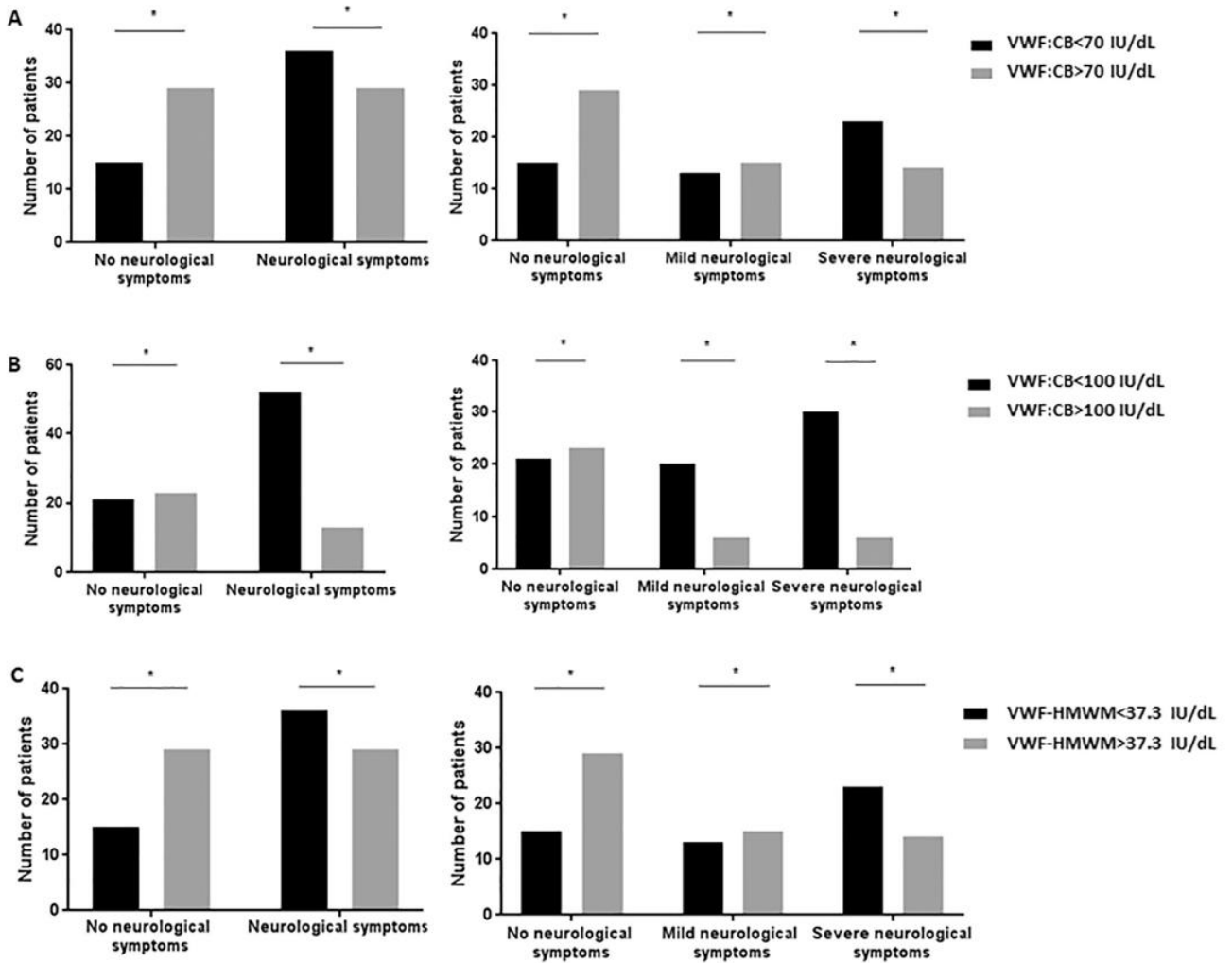
**Fig. 2.** Linear correlation between VWF:CB and VWF-HMWM levels performed in 123 patients with TTP (114 acquired TTP and 9 USS). VWF-HMWM: high molecular weight multimers of von Willebrand Factor; VWF:CB: von Willebrand Factor collagen binding capacity. Correlation coefficient calculated with Pearson's formula was  $r = 0.5979$ ,  $p < 0.0001$ .

being markedly more frequent within the VWF:CB < 70 IU/dL group ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3A). Neurological symptoms data were available in 109 of our 114 patients, and within the 51 who had VWF:CB < 70 IU/dL, 36 (36/51 = 70.6%) exhibited such sign (13/51 = 25.6% only had minor symptoms while 23/51 = 45.0% had at least one severe neurological symptom). However, amongst the 58 patients showing VWF:CB > 70 IU/dL, only 29 (29/58 = 50%) exhibited any form of neurological symptoms (15/58, 25.9% only experienced mild symptoms while 14/58, 24.1% were diagnosed with at least one severe neurological symptom).

This association with neurological features is even more marked if the cut-off value for VWF:CB is set at 100 IU/dL (VWF:CB < 100 IU/dL,  $n = 77$ ; VWF:CB > 100 IU/dL,  $n = 37$ ), with lowered  $p$  values (respectively  $p < 0.001$  if considering neurological symptoms as opposed to no neurological symptoms;  $p < 0.01$  if considering the severity of neurological symptoms) (Fig. 3B). VWF-HMWM level cut-off value was set at 37.3 IU/dL, according to our experiments on normal pooled plasma, with 56 patients having HMW-VWF multimers level < 37.3 IU/dL and 58 patients HMW-VWF multimers level > 37.3 IU/dL. Similarly than with the VWF:CB cut off set at 70 IU/dL, our study shows an association between the loss of VWF-HMWM and neurological impairment. Out of the 109 patients for which neurological symptoms data were available, 51 had VWF-HMWM level < 37.3 IU/dL, 36 of which had neurological symptoms (36/51: 70.5%): 13 exhibited mild symptoms (13/51: 25.5%) while 23 (23/51: 45.0%) experienced severe neurological symptoms. In the 58 remaining patients with VWF-HMWM level > 37.3 IU/dL, only 29 experienced neurological symptoms (29/58: 50%) with roughly half with mild and half with severe symptoms (respectively 15/58 = 29.9% and 14/58 = 24.1%) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3C).

VWF:CB < 70 IU/dL was also associated with deeper thrombocytopenia: mean platelet count in the VWF:CB < 70 IU/dL group was  $17 \times 10^9/L$  (standard deviation  $15 \times 10^9/L$ ) versus  $32 \times 10^9/L$  (standard deviation  $45 \times 10^9/L$ ) in the VWF:CB > 70 IU/dL group ( $p < 0.05$ ) (data not shown). Unexpectedly, we found an association between VWF:CB < 70 IU/dL and positive anti-ADAMTS13 IgG. Amongst the 112 patients on 114 where this data was available, anti-ADAMTS13 IgG were found positive in 49 out of 53 patients with VWF:CB < 70 IU/dL (49/53 = 92.5%) while they were only found positive in 46 of the remaining 59 patients (46/59 = 78%) with VWF:CB > 70 IU/dL ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4A).



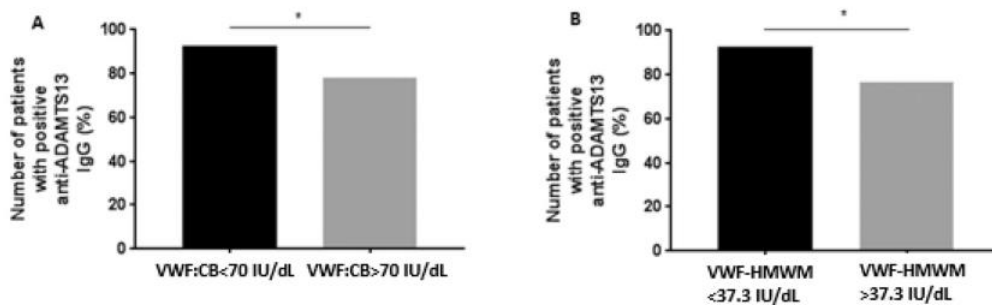


**Fig. 3.** Correlation of neurological symptoms with VWF:CB and VWF-HMWM level in 114 acquired TTP patients. Neurological symptoms in 114 acquired TTP patients are more frequent in lowered VWF:CB group compared to normal or elevated VWF:CB group, (A) VWF:CB cut-off set at 70 IU/dL and (B) VWF:CB cut-off set at 100 IU/dL (lowest and highest values for VWF:CB assay as stated by the French National Reference Center for von Willebrand Disease [10]). Neurological symptoms in 114 acquired TTP patients are more frequent in lowered VWF-HMWM level group compared to elevated VWF-HMWM levels (C) (cut-off value: 37.3 IU/dL). \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ . Mild neurological symptoms: headache and/or confusion. Severe neurological symptoms: seizure, coma, cerebral ischemia.

As with VWF:CB, an association with positive anti-ADAMTS13 IgG and HMW-VWF multimers < 37.3 IU/dL was highlighted in this study: 52 out of 56 patients with HMW-VWF multimers < 37.3 IU/dL had positive anti-ADAMTS13 IgG (52/56: 92.9%) while only 43 of the

remaining 56 patients with HMW-VWF multimers > 37.3 IU/dL had such profile (46/56 = 76.8%) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4B).

No association was found between platelet count and VWF-HMWM levels, and no association was found between sex, age, hemoglobin,



**Fig. 4.** Correlation of detectable anti-ADAMTS13 IgG with VWF:CB and VWF-HMWM in 114 acquired TTP patients. VWF:CB < 70 IU/dL (A) and VWF-HMWM < 37.3 IU/dL (B) are associated with more frequent positive anti-ADAMTS13 IgG. \*:  $p < 0.05$ .

acute kidney failure, the occurrence of a relapse and both VWF:CB and VWF-HMWM (data not shown).

#### 4. Discussion

This study focusing on acquired TTP shows that VWF-HMWM could partially explain the clinical variability exhibited by TTP patients, and that VWF-HMWM can satisfactorily be assessed by VWF:CB, much easier to carry out than electrophoresis.

Demographic, biological and clinical data are consistent with previous descriptions of large TTP cohorts [14–17], with however an apparent over-representation of idiopathic TTP, probably related to the exclusion criteria of our study.

USS patients exhibited as expected high levels of VWF-HMWM and higher than normal VWF:CB, consistent with the constant excess of HMW due to the genetic deficiency of ADAMTS13. These profiles were used as internal control to evaluate the performances of both electrophoresis and ELISA to detect and quantify VWF-HMWM excess. However, these USS patients (well documented and monitored) regularly undergo prophylactic plasmapheresis, which could explain why some of them appear to have normal levels of both VWF:CB and VWF-HMWM.

The first aim of this work was to establish a correlation between VWF:CB and VWF-HMWM levels as methods to detect and quantify either a loss or an excess of VWF-HMWM. Our study suggests that VWF:CB is indeed a good reflect of the multimeric distribution of VWF, and as it is both much easier to carry-out and less time consuming than electrophoresis, it could replace satisfactorily the latter reference method.

Clinical and biological comparisons showed that decreased VWF-HMWM levels were associated with the presence and the severity of neurological symptoms and positive anti-ADAMTS13 IgG; decreased VWF:CB showed similar results with the addition of an association with low platelet count. It is surprising that this result is only found with VWF:CB and not with VWF-HMWM levels, and we can assume that the relatively small number of patients enrolled could not reach statistical significance. We do not however find an association between VWF-HMWM and the occurrence of a relapse, suggesting that VWF-HMWM may only be associated with the ongoing acute phase and not predict future evolution.

Studies on multimeric distribution of VWF in acquired TTP are very scarce, notably because of the technical complexity inherent in VWF multimer analysis. Moake and colleagues reached a milestone in deciphering the pathophysiology of TTP in 1982 when they reported the presence of unusually large VWF-HMWM in 4 probable USS patients and demonstrated the loss of VWF-HMWM during acute TTP episodes, thus paving the way for the discovery of ADAMTS13 [18]. This study did not, however, look into the relationship between VWF-HMWM and clinical features. The prospective study conducted by Veyradier and colleagues in 2001 on the role of ADAMTS13 in 111 cases of TMA (including 66 TTP) highlighted the vast heterogeneity of VWF multimeric distribution in TTP [12] (with roughly similar results to ours), without focusing on the potential clinical impact of VWF-HMWM. Both studies used complex in house-methods, with superior resolution and certainly a better assessment of the VWF-HMWM than the semi-automated method we used. Nonetheless, the relative ease of our method allowed us to study a quite large number of patients.

Our results suggest that acquired auto-immune TTP lead to more decreased levels of VWF-HMWM compared to non-autoimmune acquired TTP. This apparent decrease can probably be explained by a sequestration of these VWF-HMWM within the microthrombi, which are therefore not free in plasma. We can hypothesize that acquired auto-immune TTP could have a different development kinetic compared to other etiologies. Rapid formation of microthrombi leading to both deeper consumption thrombocytopenia and decreased VWF-HMWM with faster advent of neurological symptoms in acquired auto-immune

TTP could explain our results. This is further supported by a previous study on acquired TTP suggesting that TTP patients with detectable anti-ADAMTS13 IgG display a worse prognosis [19].

Although our results appear to demonstrate an association between VWF-HMWM and the clinical presentation of acquired TTP, we do not believe that the assessment of the multimeric distribution of VWF is relevant as a diagnostic or prognostic tool. It was merely used in our study as a proof of concept to understand underlying mechanisms in acquired TTP.

To our knowledge, this is the first study to focus on VWF-HMWM levels rather than percentage, and to focus on the relevance of VWF-HMWM on the clinical presentation of acquired TTP. A further study looking into a potential link between VWF-HMWM and cardiac symptoms, troponin levels and treatment could substantiate this work. Our results may offer new insights to understanding the pathophysiology of acquired auto-immune TTP.

#### Funding

This study was partially supported by the PHRC AOM05012 « ADAMTS13 dependent prognostic factors in adult and child onset thrombotic thrombocytopenic purpura », DRCD, AP-HP.

#### Declaration of Competing Interest

None.

#### Appendix A

The members of the Reference Center for Thrombotic Microangiopathies (CNR-MAT) are: Augusto Jean-François (Service de Néphrologie, dialyse et transplantation; CHU Larrey, Angers); Azoulay Elie (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Saint-Louis, Paris); Barbay Virginie (Laboratoire d'Hématologie, CHU Charles Nicolle, Rouen); Benhamou Ygal (Service de Médecine Interne, CHU Charles Nicolle, Rouen); Bordessoule Dominique (Service d'Hématologie, Hôpital Dupuytren, Limoges); Boyer Olivia (Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Necker); Charasse Christophe (Service de Néphrologie, Centre Hospitalier de Saint-Brieuc); Charvet-Rumpler Anne (Service d'Hématologie, CHU de Dijon); Chauveau Dominique (Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, CHU Ranguel, Toulouse); Choukroun Gabriel (Service de Néphrologie, Hôpital Sud, Amiens); Coindre Jean-Philippe (Service de Néphrologie, CH Le Mans); Coppo Paul (Service d'Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris); Corre Elise (Service d'Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris); Delmas Yhsou (Service de Néphrologie, Hôpital Pellegrin, Bordeaux); Deschenes Georges (Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Paris); Devidas Alain (Service d'Hématologie, Hôpital Sud-Francilien, Corbeil-Essonnes); Dossier Antoine (Service de Néphrologie, Hôpital Bichat, Paris); Dossier Claire (Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Paris); Fain Olivier (Service de Médecine Interne, Hôpital Saint-Antoine, Paris); Fakhouri Fadi (Service de Néphrologie, CHU Hôtel-Dieu, Nantes); Frémeaux-Bacchi Véronique (Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris); Galicier Lionel (Service d'Immunopathologie, Hôpital Saint-Louis, Paris); Grangé Steven (Service de Réanimation Médicale, CHU Charles Nicolle, Rouen); Guidet Bertrand (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Saint-Antoine, Paris); Halimi Jean-Michel (Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Bretonneau, Tours); Hamidou Mohamed (Service de Médecine Interne, Hôtel-Dieu, Nantes); Herbrecht Raoul (service d'Oncologie et d'Hématologie, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg); Hié Miguel (Service de Médecine Interne, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris); Jacobs Frédéric (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Antoine Béclère, Clamart); Joly Bérangère (Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Paris); Kanouni Tarik (Unité d'Hémathèse, Service d'Hématologie,



CHU de Montpellier); Kaplanski Gilles (Service de Médecine Interne, Hôpital la Conception, Marseille); Lautrette Alexandre (Service de Néphrologie Pédiatrique B, Hôpital Hôtel-Dieu, Clermont-Ferrand); Le Guern Véronique (Unité d'Hémaphèrese, Service de Médecine Interne, Hôpital Cochin, Paris); Lequintrec Moglie (Service de Néphrologie, CHU de Montpellier); Loirat Chantal (Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Paris); Moulin Bruno (Service de Néphrologie, Hôpital Civil, Strasbourg); Mousson Christiane (Service de Néphrologie, CHU de Dijon); Ojeda Uribe Mario (Service d'Hématologie, Hôpital Emile Muller, Mulhouse); Ouchenir Abdelkader (Service de Réanimation, Hôpital Louis Pasteur, Le Coudray); Parquet Nathalie (Unité de Clinique Transfusionnelle, Hôpital Cochin, Paris); Peltier Julie (Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale, Hôpital Tenon, Paris); Pène Frédéric (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Cochin, Paris); Perez Pierre (Service de Réanimation polyvalente, CHU de Nancy); Poullin Pascale (Service d'hémaphèrese et d'autotransfusion, Hôpital la Conception, Marseille); Pouteil-Noble Claire (Service de Néphrologie, CHU Lyon-Sud, Lyon); Presne Claire (Service de Néphrologie, Hôpital Nord, Amiens); Provôt François (Service de Néphrologie, Hôpital Albert Calmette, Lille); Rondeau Eric (Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale, Hôpital Tenon, Paris); Saheb Samir (Unité d'Hémaphèrese, Hôpital la Pitié-Salpêtrière, Paris); Schlemmer Benoît (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Saint-Louis, Paris); Seguin Amélie (Service de Réanimation Médicale, centre hospitalier de Vendée); Servais Aude (Service de Néphrologie, CHU Necker-Enfants Malades); Stépanian Alain (Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Lariboisière, Paris); Vernant Jean-Paul (Service d'Hématologie, Hôpital la Pitié-Salpêtrière, Paris); Veyradier Agnès (Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Paris); Vigneau Cécile (Service de Néphrologie, Hôpital Pontchaillou, Rennes); Wynckel Alain (Service de Néphrologie, Hôpital Maison Blanche, Reims); Zuber Julien (Service de Néphrologie, CHU Necker-Enfants Malades); and Zunic Patricia (Service d'Hématologie, Groupe Hospitalier Sud-Réunion, la Réunion).

## References

- [1] J.E. Sadler, Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura, *Blood* 112 (1) (2008) 11–18.
- [2] M. Furlan, R. Robles, M. Galbusera, et al., Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome, *N. Engl. J. Med.* 339 (22) (1998) 1578–1584.
- [3] F. Peyvandi, S. Lavoretano, R. Palla, et al., ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission, *Haematologica* 93 (2) (2008) 232–239.
- [4] G.G. Levy, W.C. Nichols, E.C. Lian, et al., Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura, *Nature* 413 (6855) (2001) 488–494.
- [5] H.-M. Tsai, E.C. Lian, Antibodies to Von Willebrand factor-cleaving protease in acute TTP, *N. Engl. J. Med.* 339 (22) (1998) 1585–1594.
- [6] B.S. Joly, P. Coppo, A. Veyradier, Thrombotic thrombocytopenic purpura, *Blood* 129 (21) (2017) 2836–2846.
- [7] J.A. Kremer Hovinga, P. Coppo, B. Lämmle, et al., Thrombotic thrombocytopenic purpura, *Nat. Rev. Dis. Prime.* 3 (2017) 17020.
- [8] M. Stöckschlaeder, R. Schneppenheimer, U. Budde, Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 25 (3) (2014) 206–216.
- [9] J.E. Sadler, U. Budde, C. Eikenboom, et al., Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor, *J. Thromb. Haemost.* 4 (10) (2006) 2103–2114.
- [10] A. Veyradier, P. Boisseau, E. Fressinaud, et al., A laboratory phenotype/genotype correlation of 1167 French patients from 670 families with von Willebrand disease, *Medicine* 95 (11) (2016) 1–11.
- [11] E.J. Favaloro, Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease, *Am. J. Hematol.* 92 (1) (2017) 114–118.
- [12] A. Veyradier, B. Obert, A. Houllier, et al., Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases, *Blood* 98 (6) (2001) 1765–1772.
- [13] K. Kokame, Y. Nobe, Y. Kokubo, et al., FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay, *Br. J. Haematol.* 129 (1) (2005) 93–100.
- [14] E. Mariotte, E. Azoulay, L. Galicier, et al., Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy, *Lancet Haematol.* 3 (5) (2016) 237–245.
- [15] M. Scully, H. Yarranton, J. Cavenagh, et al., Regional UK TTP Registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features, *Br. J. Haematol.* 142 (5) (2008) 819–826.
- [16] Y. Fujimura, M. Matsumoto, Registry of 919 patients with thrombotic microangiopathies across Japan: database of Nara Medical University during 1998–2008, *Intern. Med.* 49 (1) (2009) 7–15.
- [17] J.N. George, J.A.K. Hovinga, D.R. Terrell, et al., The Oklahoma Thrombotic Thrombocytopenic Purpura–Hemolytic Uremic Syndrome Registry: the Swiss connection, *Eur. J. Haematol.* 80 (4) (2008) 277–286.
- [18] J.L. Moake, C.K. Rudy, J.H. Troll, et al., Unusually large plasma factor VIII: Von Willebrand Factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura, *N. Engl. J. Med.* 307 (23) (1982) 1432–1435.
- [19] P. Coppo, M. Wolf, A. Veyradier, et al., Prognostic value of inhibitory anti-ADAMTS13 antibodies in adult-acquired thrombotic thrombocytopenic purpura, *Br. J. Haematol.* 132 (1) (2006) 66–74.



Ainsi, dans ce travail, nous avons montré d'une part que la répartition multimérique du VWF, et en particulier la détection et la quantification d'un excès de VWF-HPM, peut être évaluée par deux trousseaux commerciales : l'électrophorèse des multimères du VWF semi-automatisée, et le VWF:CB qui a l'avantage d'être une méthode ELISA aisée. Nos résultats confortent le travail réalisé par notre groupe en 2001<sup>118</sup> et montrent qu'aucune distribution multimérique particulière du VWF n'est spécifique du PTT à la phase aiguë puisque les VWF-HPM y sont aussi bien déficients, normaux ou en excès. Les résultats retrouvés chez les 6 PTT obstétricaux de cette cohorte sont d'ailleurs tous aussi hétérogènes que ceux de la cohorte générale. De manière intéressante, cependant, la confrontation clinico-biologique de la cohorte de patients PTT acquis en phase aiguë à la répartition des multimères du VWF montre que la perte de VWF-HPM est associée à des caractéristiques étant celles du PTTi : une auto-immunité anti-ADAMTS13 et une présentation initiale plus sévère (gravité de l'atteinte neurologique et profondeur de la thrombopénie). Ces résultats contribuent à la compréhension physiopathologique de l'histoire naturelle du PTT et en particulier du PTTi. Cependant, l'intérêt diagnostique et pronostique de la distribution multimérique du VWF à la phase aiguë du PTT apparaît très limité en raison de sa grande hétérogénéité. C'est la raison pour laquelle il ne nous a pas paru pertinent d'étendre cette étude à la cohorte obstétricale de PTT. Dans le second volet de ce chapitre méthodologique, nous nous sommes focalisés sur le développement et l'évaluation au laboratoire de méthodes d'étude d'ADAMTS13 ciblées sur le diagnostic rapide du PTT : d'une part un TROD, d'autre part une méthode automatisée par chimiluminescence, tous deux dédiés à la mesure de l'activité d'ADAMTS13.

## **2. Evaluation d'un test rapide d'orientation diagnostique et d'une méthode automatisée de mesure de l'activité d'ADAMTS13.**

Le développement et la validation externe de scores de probabilité clinico-biologique, French Score et PLASMIC Score, permettent un diagnostic présomptif rapide de PTT idiopathique et une prise en charge thérapeutique rapide<sup>208,209,344,345</sup>. La confirmation formelle du diagnostic de PTT repose sur la documentation d'une activité d'ADAMTS13 effondrée. En contexte obstétrical, cette conduite à tenir est confrontée à plusieurs limites. Tout d'abord, les scores de probabilité clinico-biologique n'ont pas été validés pour le PTT associé à un contexte clinique, a fortiori la grossesse ou le post-partum. D'autre part, la survenue d'un syndrome de MAT en contexte obstétrical conduit à évoquer plusieurs entités pathologiques pouvant partager des caractéristiques cliniques et biologiques, mais dont la prise en charge varie considérablement, en particulier en termes de recours à la plasmathérapie et aux immunosuppresseurs<sup>294</sup>. Le diagnostic différentiel le plus rapide possible entre la pré-éclampsie, le HELLP syndrome (complicant 2 à 8% des grossesses<sup>304</sup>) avec d'autres formes de MAT nettement plus rares comme le PTT (complicant 1 grossesse sur 17 000 à 200 000<sup>138,161</sup>) est donc crucial.

Un test rapide d'orientation diagnostique (TROD), le Technoscreen® ADAMTS13 Activity (Technoclone, Vienne, Autriche) sur plasma citraté a récemment été développé et commercialisé dans le but de détecter un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 par une méthode semi-quantitative. Cette trousse commerciale contient l'ensemble des réactifs et pipettes nécessaires, ce qui peut faciliter son utilisation en laboratoire d'urgence ou en examen de biologie médicale délocalisée. Nous avons réalisé une étude monocentrique prospective sur 111 plasmas citratés de patients présentant une suspicion de MAT et prélevés dans le cadre des soins. Les performances analytiques et diagnostiques de ce TROD ont été comparées aux résultats de mesure de l'activité d'ADAMTS13 par la méthode de référence FRETS-VWF73. La réalisation technique et l'interprétation des résultats du TROD ont été réalisés en double aveugle. Cette évaluation met en évidence les limites techniques de ce TROD, avec un nombre élevé de prélèvements ininterprétables (25/111, 22,5%) et une ambiguïté de lecture (16/111, 14,4%). La valeur prédictive négative pour la détection d'un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 est de 97% et ce TROD pourrait aider au diagnostic d'exclusion du PTT. Toutefois les performances diagnostiques globales de ce TROD (sensibilité 89%, spécificité 83%, valeur prédictive positive 57%) confirment son intérêt limité. Notre évaluation a été publiée sous forme de communication affichée en congrès national en 2021.



## Evaluation du test rapide d'orientation diagnostique Technoscreen® ADAMTS13 Activity pour la détection d'un déficit sévère en ADAMTS13

N. Béranger<sup>1,2</sup>, S. Benghezal<sup>1,2</sup>, J. Hilaire<sup>1</sup>, M. Lejeune<sup>1</sup>, S. Capdenat<sup>1,2</sup>, A. Delton<sup>1,2</sup>, A. Stepanian<sup>1,2</sup>, B. Joly<sup>1,2</sup>, P. Coppo<sup>3</sup>, A. Veyradier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Service d'Hématologie biologique, CRMR des MAT-laboratoire ADAMTS13, FSMR MaRIH, DMU BioGeM, Hôpital Lariboisière, AP-HP.Nord, Université de Paris, Paris, France

<sup>2</sup> EA-3518 Recherche clinique en hématologie, immunologie et transplantation, Groupe MicroAngiopathies Thrombotiques, VWF et ADAMTS13, Institut de Recherche Saint Louis - Université de Paris, Paris, France;

<sup>3</sup> Service d'Hématologie clinique et thérapie cellulaire, CRMR des MAT, DMU ORPHÉ, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP.Sorbonne Université, Paris, France



### INTRODUCTION

Le purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) est une microangiopathie thrombotique (MAT) définie par un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 (activité < 10 %), la protéase spécifique de clivage du facteur Willebrand (VWF). Le diagnostic présomptif de PTT repose sur des scores clinico-biologiques validés comme le French score [1]. Le diagnostic de certitude repose sur la mesure de l'activité d'ADAMTS13, un examen hyperspécialisé réalisé dans des laboratoires experts. Un test rapide d'orientation diagnostique (TROD) détectant une activité d'ADAMTS13 effondrée pourrait aider au diagnostic et à la prise en charge rapide d'une suspicion de PTT. Le TROD Technoscreen® (figure1) ADAMTS13 Activity (Technoclone®, Vienne, Autriche) propose une mesure semi-quantitative (0-10-40-80%) de l'activité d'ADAMTS13 en 30 minutes (Figure 1) et pourrait aider à l'orientation diagnostique rapide du PTT.



Figure 1 : Exemple de TROD Technoscreen®

La membrane de gauche correspond au dépôt du plasma du patient et la membrane de droite correspond au dépôt du contrôle interne de qualité. La couleur de la membrane est comparée à celle d'une bandelette fournie indiquant l'activité d'ADAMTS13 de façon semi-quantitative.

### RESULTATS

La répartition des prélèvements en fonction de l'activité d'ADAMTS13 mesurée par la technique de référence est présentée dans le **Tableau 1**. Les performances analytiques et diagnostiques du TROD Technoscreen® pour le dépistage de PTT sont présentées dans le **Tableau 2**.

Une ambiguïté de lecture (discordance de lecture entre les deux opérateurs) a été notée pour 16 échantillons (14,4%). Parmi les 25 prélèvements inexploitables (22,5%), les principales difficultés rencontrées étaient un CIQ non conforme (14/111, 12,6%) ou un défaut d'absorption de la membrane du test (9/111, 8,1%).

Tableau 1 : Répartition des prélèvements en fonction de l'activité d'ADAMTS13 par technique FRET5-VWF73

| Activité d'ADAMTS13 par technique FRET5-VWF73 (%) | Nombre d'échantillons |
|---|-----------------------|
| <10%  | 23                    |
| 10-30%  | 19                    |
| 31-50%  | 32                    |
| >51%  | 35                    |
| Prélèvements auto-fluorescents                    | 2                     |
| <b>Total</b>                                      | <b>111</b>            |

Tableau 2 : Performances analytiques et diagnostiques du Technoscreen® au seuil de 0 % pour le dépistage de PTT

|                                | Performances du Technoscreen® par rapport au FRET5-VWF73 pour le diagnostic de PTT | Performances du Technoscreen® par rapport au Technozym® pour le diagnostic de PTT |
|--------------------------------|--|---|
| Sensibilité (%)                | 88,9   | 92,8  |
| Spécificité (%)                | 82,4   | 79,7  |
| Valeur Prédictive Positive (%) | 57,1   | 48,2  |
| Valeur Prédictive Négative (%) | 96,6   | 98,2  |
| Coefficient K (%)              | 59,2   | 52,9  |

### OBJECTIFS

Evaluer les performances diagnostiques du TROD Technoscreen® pour la détection d'un déficit sévère en ADAMTS13.

### CONCLUSION

Nos résultats suggèrent que le Technoscreen® est un TROD potentiellement utile pour le diagnostic d'exclusion du PTT grâce à sa très bonne VPN. Cependant, la proportion importante de résultats inexploitables (22,5%) et d'ambiguïté de lecture (14,4%) imposent une confirmation du résultat par une méthode quantitative. Des études complémentaires comparant les performances du Technoscreen® aux scores de probabilité clinico-biologiques comme le French score pourraient être utiles pour compléter notre évaluation.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Benhamou et al., *Haematologica*, 2012
- 2 Kokame et al., *The British Journal of Haematology*, 2005
- 3 Joly et al., *Thrombosis Research*, 2014

### REMERCIEMENTS

Nous remercions l'ensemble des membres du Centre National de Référence des Micro-Angiopathies Thrombotiques.

Auteur correspondant : Dr Nicolas BERANGER – nicolas.beranger@aphp.fr

### MATERIEL ET METHODES

- Etude prospective monocentrique : 111 plasmas citratés prélevés devant une suspicion de MAT, dans le cadre des soins.
- Mesure de l'activité d'ADAMTS13 par la technique de référence (FRET5-VWF73) [2] et par la technique chromogénique Technozym® ADAMTS13 Activity ELISA (Technoclone, Vienna, Austria) [3]
- TROD Technoscreen® : 1 puits « contrôle interne de qualité (CIQ) » + 1 puits « plasma patient », double lecture indépendante (2 opérateurs)
- Comparaison des performances analytiques et diagnostiques du TROD par rapport à la technique de référence FRET5-VWF73 et à l'ELISA Technozym®.

Ce travail d'évaluation montre que ce TROD mérite une phase de développement complémentaire notamment ciblée sur la qualité de la membrane absorbant l'échantillon de plasma. Nous en avons informé la société Technoclone qui a reconnu qu'une commercialisation large de ce TROD était prématurée. Conceptuellement, ce type de TROD reste néanmoins très intéressant dans les situations où les scores de probabilité du PTT sont en défaut, c'est-à-dire les MAT non idiopathiques et celles où l'urgence de diagnostic différentiel entre le PTT et d'autres MAT prend tout son sens. Les PTT obstétricaux constituent donc d'excellents candidats à une prochaine évaluation de ce TROD.

## **Deuxième publication**

Res Pract Thromb Haemost. 2020 Dec 15;5(1):81-93. doi: 10.1002/rth2.12461

### **Diagnosis and follow-up of thrombotic thrombocytopenic purpura with an automated chemiluminescent ADAMTS13 activity immunoassay**

Nicolas Béranger<sup>1,2</sup>, Sandrine Benghezal<sup>1,2</sup>, Bérangère S. Joly<sup>1,2</sup>, Sophie Capdenat<sup>1,2</sup>, Adeline Delton<sup>1,2</sup>, Alain Stepanian<sup>1,2</sup>, Paul Coppo<sup>2,3</sup>, Agnès Veyradier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Service d'hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, AP-HP.Nord and EA3518, Institut de Recherche Saint-Louis, Université Paris Cité, Paris, France

<sup>2</sup> French National Reference Centre for Thrombotic Microangiopathies, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, France

<sup>3</sup> Département d'hématologie clinique, Hôpital Saint Antoine, APHP.Sorbonne Université, Paris, France

La mesure de l'activité d'ADAMTS13 est une activité de biologie médicale spécialisée et réalisée essentiellement dans des laboratoires de CHU. Une décennie de recherche clinique a été nécessaire entre la première méthode de mesure de l'activité d'ADAMTS13 en 1997<sup>117</sup> et le développement par l'équipe de Kokame d'une méthode de référence appliquée au diagnostic médical dans le cadre des soins<sup>219</sup>. La méthode de référence FRETTS-VWF73, certes plus aisée que les méthodes historiques de première génération, nécessite malgré tout un degré élevé d'expertise tant technique que médicale et reste réservée à quelques laboratoires référents. La méthode de mesure de l'activité d'ADAMTS13 utilisée dans la majorité des laboratoires hospitaliers et dans quelques laboratoires privés est une méthode chromogénique de type ELISA commercial (Technozym® ADAMTS13 Activity assay, Technoclone, Vienne, Autriche) d'utilisation simple mais dont les limites en termes de sensibilité et spécificité sont connues<sup>221</sup>. Ces deux méthodes sont réalisées sur plasma citraté. Dans la grande majorité des situations, les délais d'acheminement, de réalisation technique et de validation biologique ne permettent pas un rendu de résultat de l'activité d'ADAMTS13 dans un délai compatible avec une situation d'urgence. Enfin, plus largement, ces méthodes souffrent d'une mauvaise robustesse dans la zone d'activité d'ADAMTS13 comprise entre 10 et 25 UI/dL. Cette zone est pourtant critique tant pour le suivi des patients PTTi en rémission pour la détection d'une rechute biologique ou clinique que pour la surveillance d'un traitement par caplacizumab à la phase aiguë du PTT, dont l'arrêt est actuellement conditionné par une activité > 20 UI/dL.

En 2017, une nouvelle méthode automatisée et rapide de mesure de l'activité d'ADAMTS13 sur plasma citraté par chimiluminescence a été développée<sup>223</sup>. La trousse commerciale HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay sur photo-automate ACL AcuStar® (Instrumentation Laboratory, Bedford, Massachusetts, Etats-Unis) a fait l'objet de plusieurs évaluations rétrospectives internationales<sup>346-349</sup>. Ces évaluations ont toutefois comme limites un nombre restreint d'échantillons et l'absence d'étude en condition de vie réelle. Nous avons donc conduit une étude monocentrique sur un nombre important d'échantillons de plasma citraté, d'une part rétrospectivement à partir de la biobanque du CNR-MAT et d'autre part prospectivement en conditions de vie réelle. Cette étude a pour objectif de comparer les performances diagnostiques de l'HemosIL AcuStar® ADAMTS13 activity assay par rapport à la méthode de référence FRETTS-VWF73. Une évaluation des performances analytiques, notamment la robustesse dans la zone 10-25 UI/dL d'activité d'ADAMTS13 et la validation de cette méthode sur sérum ont également été effectuées.

Nous avons inclus 316 prélèvements issus de la biobanque du CNR-MAT (prélevés entre le 1<sup>er</sup> janvier 2015 et le 31 décembre 2019) pour le volet rétrospectif et 223 prélèvements en condition de vie réelle (prélevés dans le cadre des soins du 1<sup>er</sup> janvier 2020 au 30 avril 2020) : 92 PTT acquis prélevés à la phase aiguë, 236 PTT au cours de leur suivi (rémission ou rechute), 18 PTTc, 156 autres MAT et 37 sujets sains. Ces prélèvements couvrent l'ensemble du domaine de mesure de l'activité d'ADAMTS13 mesurée par la technique FRETTS-VWF73 : < 10 UI/dL (n = 142), 11 - 25 UI/dL (n = 68), 26-50 UI/dL (n = 118), 51-100 UI/dL (n = 167), > 100 UI/dL (n = 44).

L'étude des performances analytiques de l'HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity assay met évidence une limite de détection à 0,2 UI/dL, soit près de 50 fois plus basse qu'avec la technique FRETTS-VWF73.

Les CV des essais de reproductibilité et de répétabilité (respectivement de 5,6% et de 9,7%) dans la zone d'activité d'ADAMTS13 comprise entre 10 et 25 UI/dL confirment la bonne robustesse de cette méthode dans cet intervalle critique. Le système automatisé permet une mesure rapide de l'activité d'ADAMTS13 avec une cadence de 25 mesures en une heure (25 tests par cartouche, le premier dosage est réalisé en 33 minutes, chaque échantillon additionnel nécessite une minute supplémentaire). Cette évaluation n'a pas mis en évidence d'interférence analytique avec cette méthode. En particulier, la mesure de l'activité d'ADAMTS13 par HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity assay est possible sur les prélèvements auto-fluorescents qui restent l'interférence analytique majeure empêchant l'interprétation des résultats par méthode FRET-VWF73.

La comparaison par la formule de Pearson de la mesure de l'activité d'ADAMTS13 par les méthodes FRET-VWF73 et HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity assay montre un coefficient de corrélation linéaire  $r^2 = 0,83$  ( $p < 0,0001$ ) et une tendance globale à une légère surestimation (biais moyen de 8,3 UI/dL). Les résultats de cette comparaison ciblée sur les 210 prélèvements pour lesquels l'activité d'ADAMTS13 mesurée par FRET-VWF73 est inférieure à 25 UI/dL sont globalement similaires ( $r^2 = 0,78$  ;  $p < 0,0001$  ; biais moyen 4,8 UI/dL). Cette robustesse dans la zone 10-25 UI/dL confirme tout l'intérêt de cette méthode pour le suivi au long cours des patients atteints de PTT acquis et la détection d'un déficit partiel en ADAMTS13 pouvant précéder une rechute biologique ou clinique. Elle permet également une meilleure adaptation du traitement par caplacizumab à la phase aiguë du PTT en discriminant de façon satisfaisante une activité d'ADAMTS13 supérieure ou inférieure à 20 UI/dL (seuil protecteur utilisé dans les pratiques actuelles).

Les performances diagnostiques de l'HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity assay ont été comparées aux performances de la méthode de référence. Sur les 142 échantillons pour lesquels l'activité d'ADAMTS13 mesurée par FRET-VWF73 était inférieure à 10 UI/dL, 128 ont une activité d'ADAMTS13 inférieure à 10 UI/dL par la méthode HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity. Un seul échantillon (1/397) ayant une activité d'ADAMTS13 détectable ( $> 10$  UI/dL) par la méthode FRET-VWF73 a une activité  $< 10$  UI/dL par la méthode évaluée. Une activité d'ADAMTS13 détectable (comprise entre 11 et 29 UI/dL) par HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity assay est retrouvée pour 14 prélèvements dont l'activité d'ADAMTS13 de référence est inférieure à 10 UI/dL.

Les présentations cliniques des patients concernés sont hétérogènes : 5 PTT idiopathiques, 9 PTT associés à des contextes cliniques particuliers (4 grossesses, une tuberculose, une transplantation hépatique, 3 autres situations cliniques complexes). A l'inverse, une activité d'ADAMTS13 inférieure à 10 UI/dL par HemosIL AcuStar® ADAMTS13 Activity assay est rapportée pour une patiente présentant une MAT en contexte obstétrical compliquée d'un lupus systémique et pour laquelle l'activité d'ADAMTS13 de référence est détectable (11 UI/dL).

Bien que ces 15 cas soient *stricto sensu* des discordances, nous pouvons remarquer que celles-ci restent limitées à la zone de mesure comprise entre 10 et 29%, connue pour être la plus critique et la plus justifiable de contrôle biologique (cf **Figure 12**). En théorie, ces cas discordants pourraient conduire à un sous-diagnostic de PTT (exclusion erronée du PTT) ou plus rarement ici à un surdiagnostic de PTT. En pratique, la confrontation au cas par cas avec le contexte clinique a le plus souvent conduit à

une prise en charge adaptée, guidée avant tout par la présentation clinique. Dans les 5 cas particuliers de PTT obstétricaux notamment, nous rapportons un "surdiagnostic" et quatre "sous-diagnostic" de PTT.

Dans le premier cas, la patiente présentait un tableau clinique évocateur de PTT obstétrical, dans un contexte de maladie auto-immune (lupus érythémateux disséminé). Une plasmathérapie par EP associée à une corticothérapie ont été initiés, et l'activité d'ADAMTS13 à 11 UI/dL (à la limite de détection de la méthode de référence FRET5-VWF73) documentée rétrospectivement a confirmé le diagnostic de PTT. Dans cette situation, la mesure d'activité d'ADAMTS13 à 5,1 UI/dL par chimiluminescence semble être plus cohérente avec le tableau clinico-biologique

Nous rapportons un cas de PTTc de révélation obstétricale pour lequel l'activité d'ADAMTS13 mesurée à la phase aiguë du PTT par chimiluminescence était de 13,1 UI/dL contre < 5 UI/dL par méthode FRET5-VWF73. Cette patiente a été traitée par plasmathérapie. L'activité d'ADAMTS13 mesurée par chimiluminescence, bien que détectable, était très diminuée et n'aurait probablement pas conduit à une exclusion de PTT. La discordance entre chimiluminescence et FRET5-VWF73 est un peu plus marquée pour deux patientes atteintes de PTTu obstétrical, avec une activité d'ADAMTS13 par chimiluminescence mesurée à 22 UI/dL (<10 UI/dL par méthode FRET5-VWF73) et 17 UI/dL (<5 UI/dL par méthode FRET5-VWF73) respectivement. Elles ont été traitées par plasmathérapie et corticothérapie avant documentation rétrospective de l'activité d'ADAMTS13. La présentation clinique très évocatrice de PTT de ces deux patientes (syndrome de MAT avec atteinte neurologique) n'aurait probablement pas conduit à l'interruption de la plasmathérapie mais à un contrôle de l'activité d'ADAMTS13 par méthode de référence. Enfin, la dernière patiente était connue pour PTTi depuis de nombreuses années, et a fait une rechute à l'occasion d'une grossesse. La discordance minime mise en évidence ici (11 UI/dL par méthode chimiluminescence contre <10 UI/dL par méthode de référence FRET5-VWF73) n'aurait changé ni le diagnostic ni la prise en charge.

De plus, de manière très critique, nous ne pouvons totalement exclure à ce stade la possibilité que la méthode chimiluminescente prenne en défaut le FRET5-VWF73. Cette évaluation, rétrospective comme en condition de vie réelle, objective donc les excellentes performances analytiques et diagnostiques de l'HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity assay.



## ORIGINAL ARTICLE

# Diagnosis and follow-up of thrombotic thrombocytopenic purpura with an automated chemiluminescent ADAMTS13 activity immunoassay

Nicolas Beranger PharmD<sup>1,2</sup> | Sandrine Benghezal AS<sup>1,2</sup> | Bérangère S. Joly PharmD, PhD<sup>1,2</sup> | Sophie Capdenat MSc<sup>1,2</sup> | Adeline Delton AS<sup>1,2</sup> | Alain Stepanian PharmD, PhD<sup>1,2</sup> | Paul Coppo MD, PhD<sup>2,3</sup> | Agnès Veyradier MD, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Service d'hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, AP-HP.Nord and EA3518, Institut de Recherche Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

<sup>2</sup>French National Reference Centre for Thrombotic Microangiopathies, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, France

<sup>3</sup>Département d'hématologie clinique, Hôpital Saint Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

## Correspondence

Agnès Veyradier, Service d'Hématologie biologique, Hôpital Lariboisière, 2, rue Ambroise Paré, Paris 75010, France.  
Email: agnes.veyradier@aphp.fr

**Funding information** This work was partly funded by a grant from the Délégation Régionale à la Recherche Clinique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (PHRC AOM05012). This work was also partly supported by the French National Plan for Rare Diseases of the French Ministry of Health.

**Handling Editor:** Dr Neil Zakai

## Abstract

**Background:** Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a life-threatening thrombotic microangiopathy (TMA) caused by a severe functional deficiency in ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13), the specific von Willebrand factor (VWF) cleaving protease. ADAMTS13 activity is essential to diagnose TTP but remains challenging to assess, as reference ADAMTS13 activity assays are manual and time consuming. Current techniques also lack robustness in low detectable ADAMTS13 activity range, which could prove problematic for therapy-driven monitoring.

**Objectives:** The HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay is a fast, automated chemiluminescent assay, the performance of which remains to be evaluated prospectively on very large cohorts of patients with TMA and in real-life conditions.

**Patients and Methods:** Our study was conducted over two successive sequences: a retrospective evaluation followed by a “real-life” prospective evaluation. Overall, we evaluated the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay on 539 citrated plasma samples. We extensively studied linearity, limit of detection, contamination, intra-assay and interassay precisions with a specific focus on levels < 25 IU/dL. Diagnostic performances for the detection of < 10 IU/dL ADAMTS13 activity and overall method comparison were conducted with the fluorescence resonance energy transfer (FRET)-VWF73 assay as the reference method.

**Results:** Technical performance proved excellent. Robustness in low detectable ADAMTS13 activity range was good, potentially qualifying this assay for therapy-driven monitoring. Comparison with the FRET-VWF73 assay was satisfactory

Nicolas Beranger and Sandrine Benghezal contributed equally to this paper.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2020 Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis published by Wiley Periodicals LLC on behalf of International Society on Thrombosis and Haemostasis.

( $r^2 = .83, P < .0001$ ) as were the diagnostic performances for acute-phase TTP (specificity, 99.7%; positive predictive value, 99.2%).

**Conclusion:** The HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay is a fast, reliable, automated technique well adapted as a first-line ADAMTS13 activity assay for TTP diagnosis and follow-up.

#### KEYWORDS

ADAMTS13 protein, biological monitoring, chemiluminescent assay, diagnosis, thrombotic thrombocytopenic purpura

## Essentials

- ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13) measurement is crucial for diagnosis and follow-up of thrombotic thrombocytopenic purpura.
- The HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay is a fully automated rapid quantitative immunoassay.
- The HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay was compared to FRETs-VWF73 using 539 plasma samples.
- Analytical and diagnostic performances of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity were excellent.

## 1 | INTRODUCTION

Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a rare life-threatening thrombotic microangiopathy (TMA) defined by peripheral thrombocytopenia, mechanical hemolytic anaemia, and visceral ischemia caused by a severe functional deficiency (<10 IU/dL) in ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13), the specific von Willebrand factor (VWF) cleaving protease.<sup>1,2</sup> TTP is mostly an adult acquired disease (acquired TTP [aTTP]) mainly mediated by anti-ADAMTS13 autoantibodies.<sup>3,4</sup> Much less frequently, a severe functional deficiency in ADAMTS13 can also be inherited through mutations in the ADAMTS13 gene leading to congenital TTP, also called Upshaw-Schulman syndrome (USS)<sup>5</sup>. In more than half of the cases, aTTP is an idiopathic disease, but it can also be associated with underlying situations such as infections, autoimmune disorders, malignancies, pregnancy, or grafts.<sup>3,6-9</sup> TTP is a chronic disease with acute phases interspersed with periods of clinical remissions that can vary widely in duration and marked by the risk of unpredictable relapses.<sup>10,11</sup> Patients with TTP must therefore undergo a lifetime of surveillance.

The cornerstone of TTP treatment is ADAMTS13 replacement therapy through plasma exchange (PEX)<sup>12</sup> in association with immunomodulating drugs such as corticosteroids<sup>13,14</sup> and rituximab.<sup>15,16</sup> Caplacizumab is an anti-VWF A1 domain nanobody targeting specifically the interaction between VWF A1 domain and platelet glycoprotein Iba<sup>17</sup> and blocking the formation of new microthrombi. It recently emerged as a novel strategy in association with PEX and immunomodulating agents for the treatment of acute-phase TTP. Results from the multicenter studies TITAN<sup>18</sup> and HERCULES<sup>19</sup> evaluating its efficacy showed a clear superiority compared to placebo in terms of reduction of exacerbations, and caplacizumab could join PEX and immunomodulating agents as the first-line treatment

for TTP. While TTP is a chronic disease, no long-term treatment is currently recommended, and long-term management is based on surveillance.

ADAMTS13 activity is a key parameter that drives both diagnosis and therapeutic course of action. Differential diagnosis of TTP with other TMAs can be uncertain, and the diagnosis of acute-phase TTP can be ascertained only by documenting an undetectable (<10 IU/dL) ADAMTS13 activity, a specific feature that TTP does not share with other TMAs.<sup>20</sup> ADAMTS13 activity monitoring is also recommended during initial management to demonstrate the recovery of ADAMTS13 activity defining biological remission. During follow-up, TTP patients in remission must be regularly monitored to detect any downslope of ADAMTS13 activity<sup>21-23</sup>. It is generally accepted that an ADAMTS13 activity < 10 IU/dL indicates need for preemptive therapy to prevent clinical relapses with a favorable risk-benefit balance.<sup>11</sup> Finally, during the acute phase, caplacizumab-driven therapy guidelines call for frequent ADAMTS13 activity monitoring<sup>19,24</sup>. ADAMTS13 activity is therefore a crucial tool for both initial diagnosis and follow-up of TTP.

Ever since the unraveling of TTP pathophysiology, several ADAMTS13 activity assays have been reported. They all share a similar principle, using an exogenous substrate (either full-length VWF or VWF peptide comprising the cleavage site by ADAMTS13) whose degradation products after cleavage by ADAMTS13 are secondarily detected and measured by different methods<sup>25-27</sup>: These include SDS agarose electrophoresis and immunoblotting or western blot,<sup>28,29</sup> collagen binding,<sup>30</sup> ristocetin cofactor activity,<sup>31</sup> immunoradiometric assay,<sup>32</sup> chromogenic assay,<sup>33-35</sup> or mass spectrometry.<sup>36</sup> Kokame et al<sup>37</sup> described in 2005 the fluorescence resonance energy transfer (FRETs)-VWF73 assay, using fluorescence as a means of detection of ADAMTS13 degradation products, which is now the gold standard for the measurement of ADAMTS13 activity. Most methods share the



common drawbacks of being manual and time consuming with, for all techniques except chromogenic assays, the added difficulty of requiring extensive technical expertise, which does not allow for wide around-the-clock availability. Chromogenic assays are flawed by unexplained discrepancies that prevent them from becoming reference methods.<sup>33-35</sup> Moreover, analytical interferences and a lack of robustness within the low detectable ADAMTS13 activity range (< 25 IU/dL) further complicates adequate ADAMTS13 deficiency diagnosis and follow-up.

A new fully automated fast ADAMTS13 activity assay could allow for more rapid adequate diagnosis. The HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA) is a novel, fully automated chemiluminescent technique recently developed.<sup>38</sup> Plasma samples are incubated with magnetic particles coated with VWF73, the minimal fragment of VWF required for ADAMTS13 binding and cleavage. After magnetic separation and wash, an isoluminol-tagged monoclonal antibody<sup>39</sup> specifically binds to the cleaved peptide produced by ADAMTS13 and a second incubation occurs. After a final magnetic separation and wash, the chemiluminescent reaction is triggered by specific reagents, and the emitted light is measured in relative light units by the ACL AcuStar analyzer (Instrumentation Laboratory). In this chemiluminescent assay, ADAMTS13 activity is proportional to the emitted light. The HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay has been successfully evaluated by other teams<sup>40-42</sup> on 176, 24, and 38 samples. We sought to further evaluate this new method by comparing its diagnostic performances compared to our in-house FRET5-VWF73 assay on a larger cohort of patients with TMA tested both retrospectively from a biobank and prospectively in "real-life" conditions. We also performed a specific focus on the low detectable range of ADAMTS13 activity (0-25 IU/dL) to evaluate the performance of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay in the therapy-driven monitoring during follow-up.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay analytic performances

Limit of detection and linearity were determined by serial dilutions of a known TTP plasma sample (ADAMTS13 activity < 10 IU/dL with FRET5-VWF73 assay) in normal plasma previously heated at 56°C for 2 hours and therefore devoid of ADAMTS13 activity (tested < 0.2 IU/dL).

Inter- and intra-assay precisions were calculated using internal quality controls (IQCs) and selected patient samples at critical levels. Interassay precision was determined using IQC targeting 90 IU/dL and 30 IU/dL of ADAMTS13 activity provided by the manufacturer (Instrumentation Laboratory), tested over 51 runs, and using a known TTP plasma sample (ADAMTS13 activity < 10 IU/dL with FRET5-VWF73 assay) tested over 16 runs. Intra-assay precision was assessed by repeating 10 times the assay using CRYOCHECK IQC (Abnormal and Normal Reference Controls CRYOCHECK, Cryopep,

Montpellier, France) targeting 49 IU/dL and 102 IU/dL of ADAMTS13 activity, and by repeating four times 18 distinct plasma samples from the TMA Biobank (see below) chosen to represent the set of values between 0 and 25 IU/dL of ADAMTS13 activity. Inter- and intra-assay coefficients of variability (CVs) were calculated for each set of values by dividing the standard deviation by the mean.

Contamination was checked by testing a normal sample (pre-tested; ADAMTS13 activity was 100 IU/dL) and a TTP sample (pre-tested; ADAMTS13 activity was < 0.2 IU/dL): The TTP sample testing was immediately followed by a repetition of three testings of the normal sample, which was immediately followed by a repetition of two testings of the TTP sample.

Also, to study potential analytical interferences, we studied 11 samples autofluorescent with the FRET5-VWF73 assay: Samples are autofluorescent with FRET5-VWF73 when a very strong fluorescent signal compared to the calibrant is picked from the very start of the reading, which makes ADAMTS13 activity uninterpretable. Finally, 8 hemolyzed samples, 3 icteric samples, 5 lactescent samples, 1 hemolyzed and lactescent sample, and 1 icteric and lactescent sample were also tested.

### 2.2 | Study design and blood samples

The study was designed in two successive sequences to evaluate the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay on a total of 539 citrated plasma samples. First, we performed a retrospective evaluation using 316 samples stored at -80°C between January 1, 2015, and December 31, 2019, in the biobank of the French National Reference Center for TMA (CRB-LRB, biobank BB-0033-00 064 certified NFS 96-900, Lariboisière Hospital, APHP.Nord, Paris, France). As a reminder, since 2000, all patients with a presumptive diagnosis of TMA (defined as the presence of microangiopathic hemolytic anemia with hemoglobin level < 12 g/dL and thrombocytopenia < 150 × 10<sup>9</sup>/L with or without ischemic manifestations) were prospectively enrolled in the registry of the National Reference Center for TMA (Health Ministry National Plan for Rare Diseases) and investigated for ADAMTS13 in the central French reference laboratory for ADAMTS13 for diagnostic purposes.<sup>3</sup> Second, we performed a prospective evaluation of 223 consecutive samples (either fresh or frozen at -80°C for a maximum of 3 days) tested in "real-life" conditions from January 1 to April 30, 2020.

In addition to this study performed exclusively on plasma samples, an ancillary study was conducted with plasma and serum couples obtained from the same blood collection of 100 distinct patients: 49 from the retrospective evaluation and 51 from the prospective evaluation.

### 2.3 | Blood collection and ethics

Venous blood was either collected into 1:10 final volume of 3.8% sodium citrate or into a serum tube without clot activator,

centrifuged at 3200 g for 20 minutes. Plasma or serum was then aliquoted and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and thawed 5 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  before testing.

Written informed consent was obtained from all patients according to the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Pitié-Salpêtrière (Paris, France). The study is registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) as number NCT00426686, at the Health Authority and by the French Ministry of Health as number P051064/PHRC AOM05012.

## 2.4 | ADAMTS13 activity assays

Reference ADAMTS13 activity was assessed in the context of care using our in-house FRET-VWF73 assay<sup>3,43</sup> adapted from Kokame et al<sup>37</sup> using commercial recombinant FRET-VWF73 peptide (Peptide Institute, Ibaraki, Japan) and standardized against the World Health Organization International Standard.<sup>44</sup> Normal range is between 50 IU/dL and 150 IU/dL.

An interference known as autofluorescence can prevent ADAMTS13 measurement by FRET-VWF73 assay: for those samples, ADAMTS13 activity was assessed using the chromogenic assay Technozym ADAMTS13 Activity ELISA assay (Chr-VWF73, Technoclone, Vienna, Austria) according to the manufacturer's instructions.

ADAMTS13 activity was assessed for each sample using the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay (Instrumentation Laboratory). Calibration was carried out using calibrators supplied by the manufacturers. Samples and IQC were tested following the manufacturer's instructions.

## 2.5 | Statistical analysis

Linear regression was performed using Pearson's formula. ADAMTS13 activity levels obtained with HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity and FRET-VWF73 assays were compared using Bland-Altman representation. Our in-house FRET-VWF73 assay has a limit of quantification of 10 IU/dL that can be lowered to 5 IU/dL when ADAMTS13 activity is undetectable if the relative fluorescence units (RFU) are below the limit of detection. We therefore arbitrarily decided for the statistical analysis to respectively set to 5 IU/dL and 0 IU/dL an ADAMTS13 activity that was determined  $< 10$  IU/dL with a detectable RFU and  $< 5$  IU/dL.

Continuous variables were compared with the nonparametric Mann-Whitney *U* test. The means of the differences between in-house FRET-VWF73 and HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assays between the retrospective and the prospective sequences were compared with a Mann Whitney *U* test. Agreement between methods regarding ADAMTS13 activity  $< 10$  IU/dL threshold for the diagnosis of TTP, was looked into, with FRET-VWF73 assay as gold standard. Patients with TTP were defined on clinical presentation of TTP associated with an ADAMTS13 activity  $< 10$  IU/dL with our

in-house FRET-VWF73 assay. True-positive (TP) patients were defined as patients with TTP whose ADAMTS13 activity was  $< 10$  IU/dL with the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay. False-negative (FN) patients were defined as patients with TTP whose ADAMTS13 activity was  $> 10$  IU/dL with the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay. True-negative (TN) patients were defined as patients without TTP whose ADAMTS13 activity was  $> 10$  IU/dL with the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay. False-positive (FP) patients were defined as patients without TTP whose ADAMTS13 activity was  $< 10$  IU/dL with the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay.

Sensitivity was calculated as the percentage of correctly detected TTP patients by HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay, using the formula: sensitivity (%) =  $(TP \times 100)/(TP + FN)$ . Specificity was calculated as the percentage of correctly detected patients without TTP by the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay, using the formula: specificity (%) =  $(TN \times 100)/(TN + FP)$ . Positive predictive value (PPV) was estimated as the percentage of patients with TTP among the subjects whose ADAMTS13 activity was  $< 10$  IU/dL, using the formula:  $PPV = (TP \times 100)/(TP + FP)$ . Negative predictive value (NPV) was estimated as the percentage of patients without TTP among the subjects whose ADAMTS13 activity was  $> 10$  IU/dL, using the formula:  $NPV = (TN \times 100)/(TN + FN)$ .

Observed proportionate agreement (Po) was calculated using the formula:  $Po = (TP + TN)/(TP + FP + TN + FN)$ . The probability of random agreement (Pe) was calculated using the formula:  $Pe = (TP + FN) \times (TP + FP)/(TP + FP + TN + FN)^2 + (TN + FN) \times (TN + FP)/(TP + FP + TN + FN)^2$ . Cohen's kappa coefficient was calculated to measure the agreement between our in-house FRET-VWF73 and the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assays for detecting an  $< 10$  IU/dL ADAMTS13 activity using the formula  $kappa = (Po - Pe)/(1 - Pe)$ .

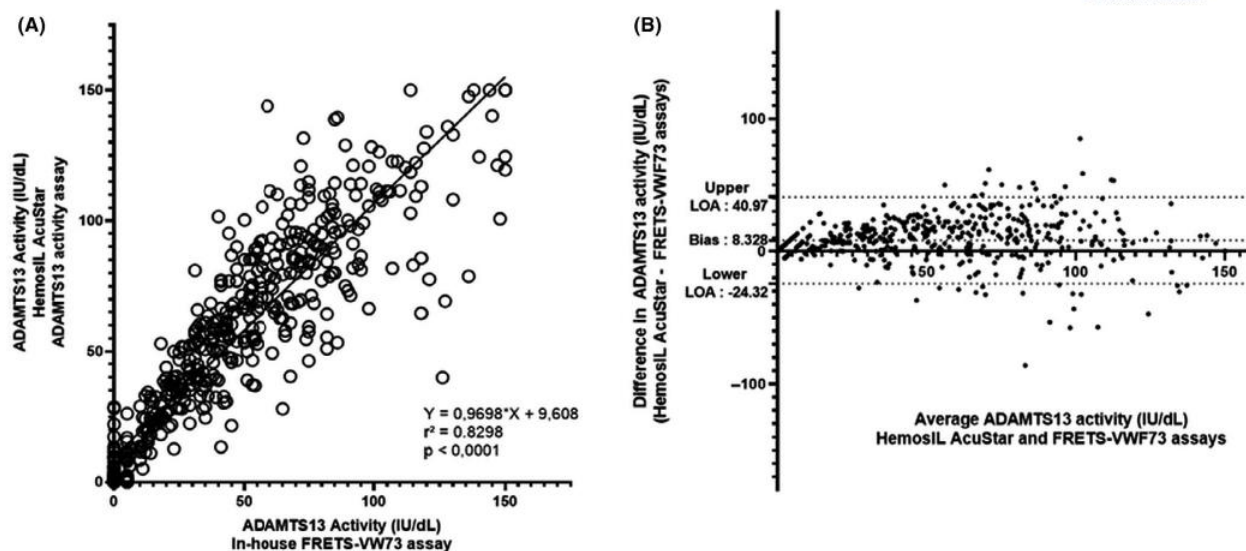
Statistical significance was set at  $P < .05$ . Statistical analysis was performed using Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Analytic performances of the HemosIL Actustar ADAMTS13 activity assay

The limit of detection was determined at 0.2 IU/dL, matching the manufacturer's claim (Figure S1). No background signal was detected when assessing the ADAMTS13 activity of the heated plasma. Linearity, assessed by serial dilutions of one aTTP plasma sample, proved excellent: Pearson's correlation coefficient  $r^2$  was 1.00 (Appendix S1: Figure S1). Interassay precisions assessed over 51 runs for the 90 IU/dL and 30 IU/dL ADAMTS13 activity IQC targets, respectively, were 9.11% and 9.64%. Interassay precision assessed over 16 runs for the known TTP plasma (ranging from  $< 0.2$  to 0.5 IU/dL) was 12.9%. Intra-assay precisions assessed with





**FIGURE 1** Scatter diagram (A) and Bland-Altman plot (B) illustrating the comparison of in-house FRET5-VWF73 assay (reference method) and HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay (evaluated method) for the measurement of ADAMTS13 activity in 539 plasma samples. With our in-house FRET5-VWF73 assay, 142 patients had an undetectable (<10 IU/dL) ADAMTS13 activity. Among those patients, 14 were found  $\geq 10$  IU/dL with the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity (false negative). Conversely, 397 patients had a detectable ADAMTS13 activity ( $\geq 10$  IU/dL) with our in-house FRET5-VWF73, and only 1 had undetectable ADAMTS13 activity (< 10 IU/dL) as measured by the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay (false positive). For the statistical analysis, values were respectively set to 5 IU/dL and 0 IU/dL if ADAMTS13 activity was determined < 10 IU/dL with a detectable RFU and < 5 IU/dL with our in-house FRET5-VWF73. Each sample is represented as a circle. Pearson's correlation coefficient ( $r^2$ ) was found at .8298 ( $P < .0001$ ), and fitted regression line was  $Y = 0.9698X + 9.608$ . The Bland-Altman plot illustrates the comparison of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assay to our in-house FRET5-VWF73. Each sample is represented by a dot. The Bland-Altman plot reveals a mean bias at 8.328 IU/dL and quite large limits of agreement (-24.32 IU/dL; +40.97 IU/dL), indicating (i) a variability between both assays for the measurement of ADAMTS13 activity and (ii) an overall tendency of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assay to overestimate results compared to our in-house FRET5-VWF73 assay

CRYOCHECK IQC repeated 10 times were 5.5% for the 102 IU/dL ADAMTS13 activity target and 3.3% for the 49 IU/dL ADAMTS13 activity target.

Specific attention was given to the intra-assay precisions of the HemosIL AcuStar in the 0-25 IU/dL ADAMTS13 activity bracket, critical for adequate monitoring during follow-up. Assays run in 16 out of the 18 samples ranging between 0 and 25 IU/dL of ADAMTS13 activity showed very satisfactory intra-assay precisions, with CV ranging from 0% to 5.6%; the 2 remaining assays showed an intra-assay CV of 22.2% in both cases (Table 1). No contamination was detected. The overall analytic performances of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay determined in our study and compared to FRET5-VWF73 are reported in Table 2.

Eleven autofluorescent plasma samples with FRET5-VWF73 assay and thus assessed by Technozym ADAMTS13 activity ELISA for reference, were tested using the HemosIL AcuStar ADAMTS13. No particular technical difficulty was met, and the ADAMTS13 activity values obtained with the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay appear consistent with clinical context and the Technozym ADAMTS13 activity ELISA. The specific features of these 11 patients are provided in Appendix S1, Table S1. Eighteen samples with classical interferences (hemolyzed, icteric, and/or lactescent samples) were tested (data not shown). Only two slight discrepancies were

reported for one icteric sample and one icteric and lactescent sample: ADAMTS13 activity assessed by our in-house FRET5-VWF73 assay was < 10 IU/dL, while ADAMTS13 activity was measured at 10.5 and 11.3 IU/dL, respectively, with the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay.

### 3.2 | Comparisons of HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay and FRET5-VWF73 assay (reference method) on plasma samples

#### 3.2.1 | Comparison of results obtained from the retrospective and the prospective evaluations

We first compared the data obtained from both sequences of the study to detect any discrepancy related to the length of storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ , which could bias our study. No significant difference was observed in the comparisons of ADAMTS13 activity between the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity and FRET5-VWF73 assays in the retrospective sequence (316 plasma samples) and in the prospective sequence (223 plasma samples) of the study (Appendix S1, Figure S2). Specific scatter diagrams and Bland-Altman diagrams for each sequence were also analyzed. Pearson's correlation coefficient was found at 0.90 and 0.78

**TABLE 1** Intra-assay precisions of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assay in the low ADAMTS13 activity range (0-25 IU/dL)

| Sample N° | ADAMTS13 activity (IU/dL) (HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay) | CV (%)           |
|-----------|---|------------------|
| 1         | <0.2  | N/A <sup>a</sup> |
| 2         | 1.3   | 5.6              |
| 3         | 1.6   | N/A <sup>a</sup> |
| 4         | 2.3   | 5.0              |
| 5         | 3.6   | 4.0              |
| 6         | 6.2   | 2.8              |
| 7         | 7.2   | 0.0              |
| 8         | 8.8   | 2.5              |
| 9         | 11.4  | 22.2             |
| 10        | 12.8  | 3.2              |
| 11        | 13.8  | 2.8              |
| 12        | 16.8  | 22.2             |
| 13        | 17.2  | 3.0              |
| 14        | 17.3  | 1.1              |
| 15        | 18.2  | 4.4              |
| 16        | 20.7  | 2.7              |
| 17        | 21.9  | 5.5              |
| 18        | 24.7  | 2.9              |

Note: Every intra-assay precision was determined on 4 consecutive testings. Internal quality controls (IQC 102 IU/dL and IQC 49 IU/dL) were previously checked valid for each run.

Abbreviations: CV, coefficient of variation; IQC, internal quality control; N/A, not applicable.

<sup>a</sup>All values were < 0.2 IU/dL.

for the retrospective evaluation and for the prospective evaluation, respectively, and was statistically significant in both cases ( $P < .0001$ ) (Appendix S1, Figure S3). Overall, we tested 539 samples, consisting of 142 samples in the < 10 IU/dL range, 68 samples in the 10-25 IU/dL range, 118 samples in the 25-50 IU/dL range, 167 samples in the 50-100 IU/dL range, 44 samples in the 100-150 IU/dL range (Table 3). Fifteen diagnostic discrepancies were found in the overall analysis including 14 samples overestimated by the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay: 7 were detected during the retrospective evaluation and 8 during the prospective evaluation (Table 4). These results allowed us to meld all 539 patients for a global comparison of methods.

### 3.2.2 | Global comparison of methods

Data from both sequences were melded, leading to a total of 539 plasma samples. The distribution of tested samples according to ADAMTS13 activity assessed by the reference method is provided in Table 3 and shows that our cohort represents extensively all values between < 10 and 150 IU/dL of ADAMTS13 activity. The comparison is represented (i) with a linear regression curve and (ii) with a Bland-Altman graphic, which are both shown in Figure 1. Pearson's correlation coefficient

**TABLE 2** Comparison of analytic performances of in-house FRET-VWF73 and HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assays

|                            | FRET-VWF73 assay | HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assay |
|----------------------------|------------------|---|
| Level of automation        | Highly manual    | Fully automated                         |
| Substrate                  | FRET-VWF73       | GST-VWF73                               |
| Detection principle        | Fluorescence     | Chemiluminescence                       |
| Limit of detection         | 10 IU/dL         | 0.2 IU/dL                               |
| Contamination              | Not applicable   | None                                    |
| Intra-assay precision (CV) | 6.9%             | 5.6%                                    |
| Interassay precision (CV)  | 10.2%            | 9.7%                                    |
| Assay length <sup>a</sup>  | 1 hour           | 33 minutes <sup>b</sup>                 |

Abbreviations: CV, coefficient of variation.

<sup>a</sup>This duration does not include sample preparation, calibration and data analysis.

<sup>b</sup>This is the time that the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay needs to assess the first sample; each subsequent sample will take an extra minute.

was calculated at 0.83 ( $P < .0001$ ), which is very satisfactory. Bland-Altman plot show a bias at 8.3, indicating a tendency to overestimate ADAMTS13 activity compared to FRET-VWF73.

Similarly, as for analytic performances shown above, specific attention was given to the comparison of both assays in the critical 0-25 IU/dL ADAMTS13 activity bracket, involving 210 samples (Figure 2). Pearson's correlation coefficient proved again to be satisfactory at 0.78 ( $P < .0001$ ). Interestingly, the Bland-Altman plot shows a bias of 4.8 IU/dL. Since the comparison with fixed values of 5 IU/dL and 0 IU/dL for < 10 IU/dL ADAMTS13 activity assessed by FRET-VWF73 could induce a bias, we also performed the statistical analysis by excluding values of ADAMTS13 activity < 10 IU/dL (data not shown). Indeed, when excluding < 10 IU/dL ADAMTS13 activity values assessed by FRET-VWF73,  $r^2$  was found at .71 ( $P < .0001$ ) and when excluding < 10 IU/dL ADAMTS13 activity values assessed by HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay,  $r^2$  was found at .73 ( $P < .0001$ ).

The diagnostic value of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity for acute TTP proved excellent, with a sensitivity of 90.1%, a specificity of 99.7%, a PPV of 99.2%, an NPV of 96.6%, and a kappa coefficient of 0.93 (Table 5). Fifteen discrepancies were detected: 14 FN and 1 FP (Table 4). The distribution of samples tested as a function of ADAMTS13 activity assessed by HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay and of clinical context is provided in Appendix S1, Figure S4.

### 3.3 | Comparison of citrated plasma versus serum samples on HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay

While the manufacturer validated the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay only on plasma, we sought to investigate whether



**TABLE 3** Distribution of assessed plasma samples according to diagnosis (1.a) and ADAMTS13 activity using in-house FRET-VWF73 assay (1.b)

|  | Retrospective sequence | Prospective sequence | Total      |
|--|------------------------|----------------------|------------|
| <b>1.a Diagnosis</b>   |                        |                      |            |
| Normal subjects  | 25                     | 12                   | 37         |
| Congenital TTP (USS)   | 11                     | 7                    | 18         |
| aTTP at initial acute phase                                      | 69                     | 23                   | 92         |
| aTTP during follow-up (in remission or relapse)                  | 122                    | 114                  | 236        |
| Miscellaneous TMAs   | 89                     | 67                   | 156        |
| <b>Total</b>   | <b>316</b>             | <b>223</b>           | <b>539</b> |
| <b>1.b ADAMTS13 activity (in-house FRET-VWF73 assay (IU/dL))</b> |                        |                      |            |
| <10  | 96                     | 46                   | 142        |
| 10-25  | 47                     | 21                   | 68         |
| 25-50  | 67                     | 51                   | 118        |
| 50-100   | 85                     | 82                   | 167        |
| 100-150  | 21                     | 23                   | 44         |
| <b>Total</b>   | <b>316</b>             | <b>223</b>           | <b>539</b> |

Abbreviations: aTTP, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP, thrombotic thrombocytopenic purpura; TMA, thrombotic microangiopathy; USS, Upshaw-Schulman syndrome.

this assay could be performed on serum. An ancillary study was conducted on 100 plasma and serum couples drawn from the same blood collection in 100 patients (Figure 3). Pearson's correlation coefficient was calculated at 0.79 ( $P < .0001$ ). The bias calculated using Bland-Atmann plot was found at 4.3, indicating a mild tendency of overestimation when assessing on serum compared to citrated plasma. This result seems consistent with the 1/10 dilution of plasma sample given that citrated plasma tubes contain a liquid anticoagulant. Thirteen citrated plasma samples had an ADAMTS13 activity  $< 10$  IU/dL assessed by HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay: agreement regarding  $< 10$  IU/dL between plasma and serum samples was perfect. Additionally, 24 citrated plasma samples had an ADAMTS13 activity  $< 25$  IU/dL; after correlation with their serum counterparts, Pearson's correlation coefficient was found at 0.73 ( $P < .0001$ ) (data not shown).

## 4 | DISCUSSION

In the current study, we evaluated the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay, a new automated, fast chemiluminescent assay for the measurement of ADAMTS13 activity. Analytic performances, robustness in the low detectable range of ADAMTS13 activity (0-25 IU/dL) including the assessment of undetectable levels ( $< 10$  IU/dL), and global comparison with our referent in-house FRET-VWF73 assay

conducted on 539 citrated plasma sample showed very good results. An ancillary study using 100 plasma-serum couples, also showed that this assay, calling for citrated plasma according to the manufacturer's instructions, could also be performed on serum.

Three previous studies evaluating the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay were published. The first one, by Favresse et al,<sup>42</sup> was a retrospective study comparing the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay to the Technozym ADAMTS13 activity ELISA on 38 citrated plasmas samples (including eight patients with TTP) and concluded favorably, highlighting the good diagnostic performances and benefits from automation of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay. Valsecchi et al<sup>40</sup> conducted a thorough evaluation and compared, through a design similar to ours with a retrospective and prospective sequence, the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay to the Technozym ADAMTS13 activity ELISA and to their in-house FRET-VWF73 on a total of 176 citrated plasma samples (including 110 TTP samples). This study, benefiting from a large cohort, also concluded very positively on the analytic and diagnostic performances of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity, notably reporting a kappa coefficient of 0.97 and only two discrepancies in terms of assessing undetectable ( $< 10$  IU/dL) ADAMTS13 activity compared to their in-house FRET-VWF73. Finally, Stratmann et al<sup>41</sup> published a third study comparing the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay to the Technozym ADAMTS13 activity ELISA on a total of 24 citrated plasma samples, confirming the practicability of automation for the measurement of ADAMTS13 activity and the good diagnostic performances of this assay.

Our results on the diagnostic performances of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay are largely consistent with these previous findings, although our findings, based on a very large cohort of 539 citrated plasma samples, show more discrepancies than the previous studies.<sup>40-42</sup> While most parameters appear very satisfactory (specificity, PPV and NPV, and kappa coefficient), the sensitivity of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay for acute-phase TTP was found at 90.1%, indicating the possibility of FN results. Our study reports 14 patients misdiagnosed out of a total of 142 patients (9.8%) with undetectable ADAMTS13 activity, 11 of which were acute-phase TTP, including 1 congenital TTP (Table 4). This apparent discrepancy compared to the other studies can be partly explained by the very large cohort of samples we studied. Moreover, our reference method was FRET-VWF73 assay and not the Technozym ADAMTS13 activity ELISA, an assay previously evaluated by our team and found to provide FN results in 12% of patients with acute TTP<sup>33</sup>. It is also noteworthy that among the 14 cases in which the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay is discrepant with FRET-VWF73 assay for identifying undetectable ( $< 10$  IU/dL) ADAMTS13 activity, 3 were complex TMAs with unspecific severe functional deficiency in ADAMTS13, or TTP-like syndrome. One of those samples was slightly icteric and another was slightly icteric and lactescent, which is of interest given that icteric samples can lead to inaccurate results with FRET-VWF73.<sup>45</sup> However, whether these interferences

**TABLE 4** Diagnostic discrepancies between HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay and in-house FRET5-VWF73 assessing < 10 IU/dL ADAMTS13 activity in 15 plasma samples

| Patient  | ADAMTS13 activity by in-house FRET5-VWF73 assay (IU/dL) | ADAMTS13 activity by HemosIL AcuStar assay (IU/dL) | Anti-ADAMTS13 IgG titers (ELISA, U/mL) (N < 15 U/mL) | Clinical context and complementary ADAMTS13 investigation                             |
|--|---|--|--|---|
| TMA  | 11  | 5.1  | 9  | Pregnancy and systemic lupus erythematosus  |
| aTTP – acute phase                               | <10   | 12   | 11   | Liver transplantation   |
| aTTP – acute phase                               | <5  | 17   | 24   | Hepatitis B, hepatocellular carcinoma, and kidney transplantation                     |
| aTTP – relapse                                   | <10   | 13   | 7  | None  |
| Congenital TTP (USS)                             | <5  | 13   | 10   | Exon 3: c.262G > C (p.Val88Leu) Exon 24: c.3178C > T (p.Arg1060Trp)                   |
| aTTP – acute phase                               | <5  | 22   | 5  | Pregnancy   |
| aTTP – acute phase                               | <10   | 17   | 6  | Pregnancy   |
| aTTP – acute phase                               | <10   | 26   | 10   | None  |
| aTTP – relapse                                   | <5  | 29   | 12   | None  |
| aTTP – acute phase                               | <10   | 16   | 16   | None  |
| TMA <sup>a</sup> (icteric and lactescent sample) | <10   | 11   | 1  | Hematopoietic stem cell transplantation and <i>Escherichia coli</i> O157:H7 infection |
| aTTP – relapse                                   | <5  | 13   | 7  | None  |
| aTTP – relapse                                   | <5  | 11   | 27   | Pregnancy   |
| TMA*   | <5  | 28   | 21   | Tuberculosis  |
| TMA <sup>a</sup> (icteric sample)                | <10   | 11   | 2  | Heart failure with congestive hepatopathy   |

Abbreviations: aTTP, acquired thrombotic thrombocytopenic purpura, TMA, thrombotic microangiopathy; TTP, thrombotic thrombocytopenic purpura; USS, Upshaw-Schulman syndrome.

<sup>a</sup>Although ADAMTS13 activity was < 10 IU/dL with FRET5-VWF73 assay, clinical context led to a diagnosis of TMA with a specific severe functional deficiency in ADAMTS13, that is, TTP-like syndrome.

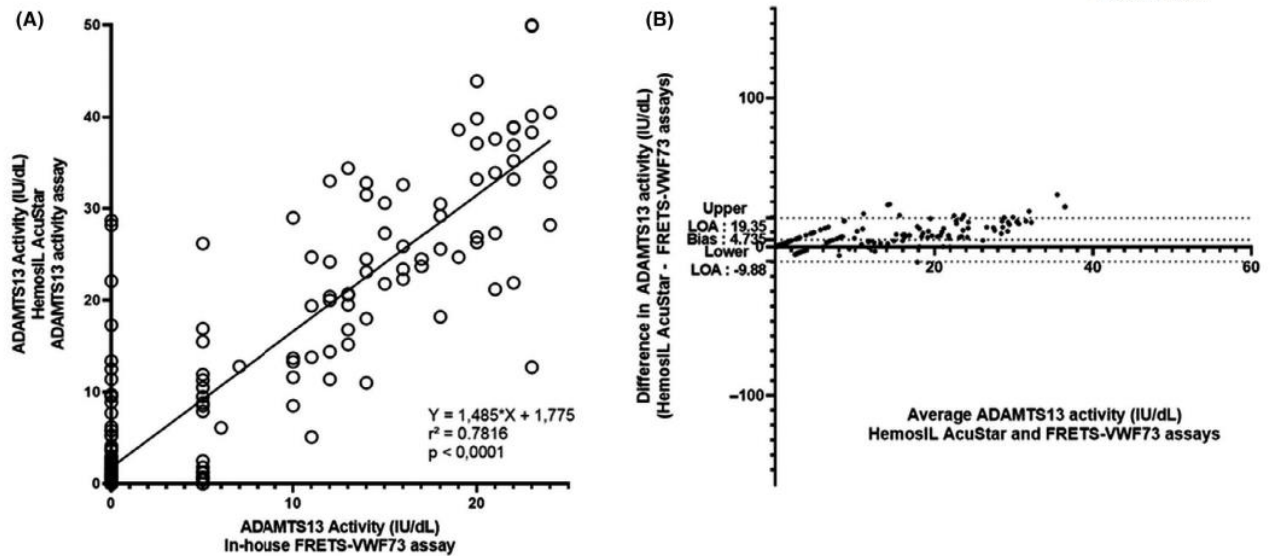
significantly affected the measurement of ADAMTS13 activity with the HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assay is uncertain, as other samples with interferences did not appear to be significantly impacted. Diagnostic performances for acute-phase TTP are very satisfactory in terms of specificity (99.7%) and PPV (99.2%), indicating that the HemosIL AcuStar ADAMTS13 assay is very unlikely to provide a FP result (only one patient in our study, a complex TMA in a pregnant patient with systemic lupus erythematosus). While our study includes a relatively high number of samples, further time and experience with the HemosIL AcuStar ADAMTS 13 Activity assay are needed to find a perfect strategy balancing its ease of use and diagnostic performances. Reference methods using both full-length VWF and VWF73 substrates should therefore be kept for backup if clinical presentation, including the French and/or PLASMIC score, and ADAMTS13 assessed by the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay appear discrepant.

Other original features of our study are the extensive evaluation of the analytic performances of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay and of the robustness of this assay in the low detectable ADAMTS13 activity range (0-25 IU/dL). This bracket is crucial for both adequate diagnosis and follow-up supporting either

caplacizumab-driven therapy or preemptive rituximab-driven therapy but remains critically difficult to assess robustly and precisely with currently available assays. Another specific end point of this work was also to determine whether this assay could be performed on serum to better suit real-life needs.

While clinical scores such as the FRENCH score<sup>46</sup> or the PLASMIC score<sup>47</sup> have significantly made TTP detection easier, differential diagnosis with other TMAs or coagulopathies can be challenging, and rapid results could accelerate initial diagnosis. The excellent analytical performances of this new assay are combined with a time of execution of 1 hour for a run including 25 samples, which could make ADAMTS13 activity available faster for clinical care and improve initial management.<sup>48</sup> Providing rapidly available results should nevertheless not be done at the expense of their reliability, and time should be taken for IQC, technical, and medical validation, ensuring that correct results are provided to physicians for clinical care. In terms of benefit for current medical practice, the comparison for plasma samples of HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay and FRET5-VWF73 showed satisfactory correlation overall and lack of interferences, in addition to its ease of use compared to FRET5-VWF73, a laborious time-consuming and expertise-requiring technique. Moreover, calibration must be performed





**FIGURE 2** Scatter diagram (A) and Bland-Altman plot (B) illustrating the comparison of in-house FRET5-VWF73 assay (reference method) and HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay (evaluated method) for the measurement of ADAMTS13 activity for 210 citrated plasma samples with ADAMTS13 activity < 25 IU/dL as assessed by in-house FRET5-VWF73 assay. For the statistical analysis, values were respectively set to 5 IU/dL and 0 IU/dL if ADAMTS13 activity was determined < 10 IU/dL with a detectable RFU and < 5 IU/dL with our in-house FRET5-VWF73 assay. Each sample is represented as a circle Pearson's correlation coefficient ( $r^2$ ) was found at .7816 ( $P < .0001$ ), and fitted regression line was  $Y = 1.485X + 1.775$ . The Bland-Altman plot illustrates the comparison of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay to our in-house FRET5-VWF73. Each sample is represented by a dot. The Bland-Altman plot specifically targeting citrated plasmas with ADAMTS13 activity < 25 IU/dL assessed by our in-house FRET5-VWF73 assay reveals a lower mean bias, at 4.735 IU/dL, and narrower limits of agreement (-9.88 IU/dL; +19.35 IU/dL) compared to the analysis conducted on all plasmas (0-150 IU/dL). This result suggests that (i) the variability is far less important between both assays in the measurement of ADAMTS13 activity in the 0-25 IU/dL range; (ii) the HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assay tends to overestimate results less compared to our in-house FRET5-VWF73 assay in the 0-25 IU/dL range

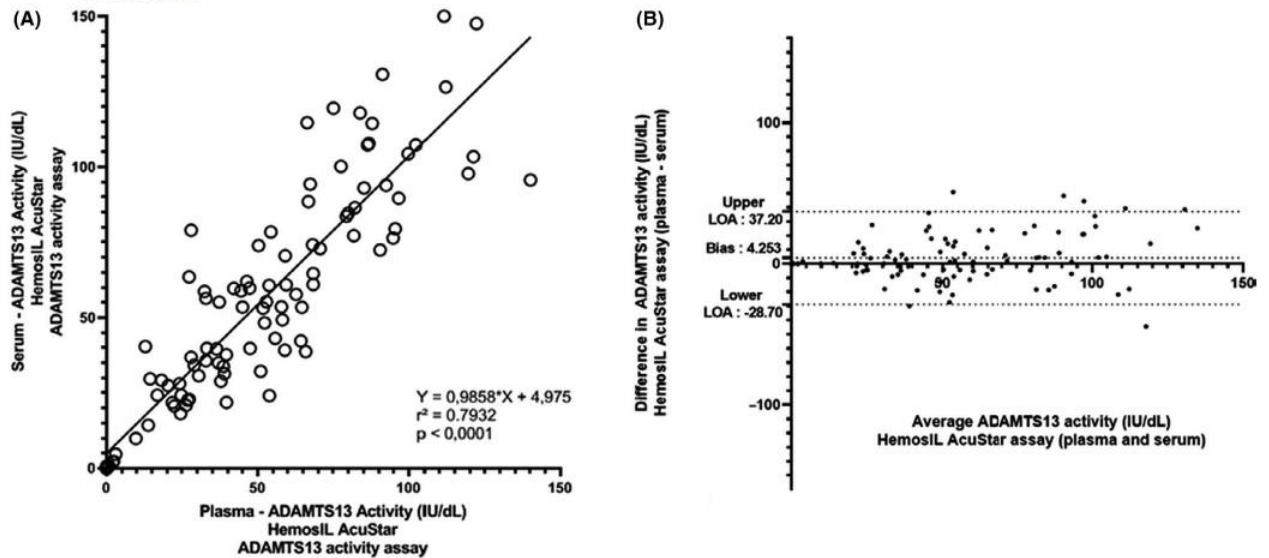
**TABLE 5** Diagnostic performance for acute phase of TTP of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assay in 539 plasma samples

|   | FRET5-VWF73             | FRET5-VWF73            |                         |
|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|
|   |                         | <10 IU/dL<br>(n = 142) | ≥ 10 IU/dL<br>(n = 397) |
| HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assay | <10 IU/dL<br>(n = 129)  | 128                    | 1                       |
|   | ≥ 10 IU/dL<br>(n = 410) | 14                     | 396                     |
| Sensitivity (%)                         |                         | 90.1                   |                         |
| Specificity (%)                         |                         | 99.7                   |                         |
| Positive predictive value (%)           |                         | 99.2                   |                         |
| Negative predictive value (%)           |                         | 96.6                   |                         |
| Cohen's kappa coefficient               |                         | 0.93                   |                         |

each time the reagent lot is changed and not every time testing is performed. Linearity and interassay precision are excellent, and no contamination was detected in this automated system. We chose to work with the manufacturer's IQC for interassay precision and with our usual supplier for intra-assay precision to check whether working with the manufacturer's IQC would result in better quality controls, which was not the case.

Analytical robustness in the low detectable ADAMTS13 activity range is also noticeably better compared to FRET5-VWF73, and the

2 out of 18 intra-assay precisions that are much higher (22.2% for both) appear to be overestimated by a random error, as the other values are much lower. This could allow for more standardized and reliable monitoring of TTP patients in remission, particularly for patients with low detectable ADAMTS13 activity, and for a more rapid identification of relapsing patients calling for preemptive rituximab. This assay also appears adequate for caplacizumab-driven therapy, given that a yet-to-be-determined cutoff ADAMTS13 activity level (likely around 20-25 IU/dL) could determine the continuation or



**FIGURE 3** Scatter diagram (A) and Bland-Altman (B) plot illustrating the comparison of ADAMTS13 activity measured in 100 plasma and serum couples using HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay. One hundred citrated plasma and serum couples drawn from the same blood collection from 100 distinct patients were tested with the HemosIL ADAMTS13 activity assay and compared, with citrated plasma as the reference. Thirteen patients had undetectable ( $<10$  IU/dL) ADAMTS13 activity on plasma samples. Agreement with serum counterparts for evidencing an undetectable ( $<10$  IU/dL) ADAMTS13 activity was perfect. Each sample is represented as a circle on the scattered diagram. Pearson's correlation coefficient ( $r^2$ ) was found at .7932 ( $P < .0001$ ), and fitted regression line was  $Y = 0.9858X + 4.975$ . The Bland-Altman plot illustrates the comparison of citrated plasma and serum on the measurement of ADAMTS13 activity assessed by the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay. Each sample is represented by a dot. The Bland-Altman plot reveals a mean bias of 4.253 IU/dL and quite large limits of agreement ( $-28.70$  IU/dL;  $+37.20$  IU/dL), indicating an overall tendency of the HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity assay to slightly overestimate results on serum compared to citrated plasma

discontinuation of caplacizumab. The determination of this cutoff ADAMTS13 activity level could be a determining parameter for the overall cost-effectiveness of caplacizumab in TTP.

The HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay has a much lower limit of detection than the gold standard FRET5-VWF73. The ADAMTS13 activity threshold value for the diagnosis of acute-phase TTP is  $< 10$  IU/dL, but the choice of this cutoff is closely related to the limit of detection of previously available methods. While acute-phase acquired TTP tends to have very low ( $<5$  IU/dL) ADAMTS13 activity, it appears that relapsing patients or patients with USS display a somewhat higher range of ADAMTS13 activity (between 5 and 10 IU/dL) (data not shown). Within the  $< 10$  IU/dL range, the comparison of the clinical context and the ADAMTS13 activity measured by the HemosIL ADAMTS13 activity remains to be performed. This new method offers a much lower limit of detection, which could in turn lower the threshold for TTP diagnosis and incidentally lower the threshold for initiating preemptive rituximab. The 10 IU/dL threshold for preemptive rituximab remains up for debate. This new assay could help identify a more adequate threshold and separate patients with  $< 10$  IU/dL ADAMTS13 activity into a group with ADAMTS13 activity closer to 0.2 IU/dL who would benefit from preemptive treatment and into another group with ADAMTS13 activity closer to 10 IU/dL for whom the risk-benefit balance might lean toward monitoring alone. In addition,

it greatly improves the possibility of studying USS samples for genotype-phenotype studies, which were so far hindered by the high limit of detection of reference methods. Our study, the first to include USS, reports notably an adult patient with USS with pregnancy-onset TTP that was misdiagnosed with the HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay at 13 IU/dL. Finally, regarding the use of serum in addition to citrated plasma, ADAMTS13 activity assay is performed in limited expert laboratories, sometimes covering a wide geographic area. Preanalytical handling and transport of aliquoted frozen citrated plasma can be difficult in such conditions, with the risk of faulty results if mishandled. Serum samples are easier to handle and already regularly used for that matter, leading our team to investigate the use of serum for performing FRET5-VWF73. The AcuStar is indeed an automated system capable of performing many specialized hemostasis assays on plasma or on serum samples, for example, antiphospholipid antibodies. While reports that thrombin generated during the clotting process may degrade ADAMTS13 have been published,<sup>49</sup> our data show that testing on serum does not provide FP results. Moreover, our real-life experience of measuring ADAMTS13 on serum rather than plasma show identical diagnostic performance. Serum testing should, however, be performed with caution until further validation has been performed. Finally, since EDTA completely eliminates the enzyme activity, EDTA plasma specimens are absolutely not to be used.



The HemosIL AcuStar ADAMTS13 activity assay appears very reliable and easy to perform. This method could thus replace current techniques as a first-line assay for both TTP initial diagnosis and follow-up, with an obvious benefit for therapy-driven monitoring. However, confrontation with clinical data remains crucial, and if ADAMTS13 activity appears to conflict with clinical presentation, it must be controlled with a reference method in experienced laboratories.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the members of the Reference Center for Thrombotic Microangiopathies (CNR-MAT): Augusto Jean-François (Service de Néphrologie, dialyse et transplantation ; CHU Larrey, Angers); Azoulay Elie (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Saint-Louis, Paris); Barbay Virginie (Laboratoire d'Hématologie, CHU Charles Nicolle, Rouen); Benhamou Ygal (Service de Médecine Interne, CHU Charles Nicolle, Rouen); Bordessoule Dominique (Service d'Hématologie, Hôpital Dupuytren, Limoges); Charasse Christophe (Service de Néphrologie, Centre Hospitalier de Saint-Brieuc); Charvet-Rumpler Anne (Service d'Hématologie, CHU de Dijon) ; Chauveau Dominique (Service de Néphrologie et Immunologie Clinique, CHU Rangueil, Toulouse); Choukroun Gabriel (Service de Néphrologie, Hôpital Sud, Amiens); Coindre Jean-Philippe (Service de Néphrologie, CH Le Mans); Coppo Paul (Service d'Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris); Corre Elise (Service d'Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris); Delmas Yhsou (Service de Néphrologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux); Deschenes Georges (Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Paris); Devidas Alain (Service d'Hématologie, Hôpital Sud-Francilien, Corbeil-Essonnes); Dossier Antoine (Service de Néphrologie, Hôpital Bichat, Paris); Fain Olivier (Service de Médecine Interne, Hôpital Saint-Antoine, Paris); Fakhouri Fadi (Service de Néphrologie, CHU Hôtel-Dieu, Nantes) ; Frémeaux-Bacchi Véronique (Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris); Galicier Lionel (Service d'Immunopathologie, Hôpital Saint-Louis, Paris); Grangé Steven (Service de Réanimation Médicale, CHU Charles Nicolle, Rouen) ; Guidet Bertrand (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Saint-Antoine, Paris); Halimi Jean-Michel (Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Bretonneau, Tours); Hamidou Mohamed (Service de Médecine Interne, Hôtel-Dieu, Nantes); Herbrecht Raoul (service d'Oncologie et d'Hématologie, Hôpital de Haute-pierre, Strasbourg); Hié Miguel (Service de Médecine Interne, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris) ; Jacobs Frédéric (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart); Joly Bérangère (Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Paris) ; Kanouni Tarik (Unité d'Hémaphrèse, Service d'Hématologie, CHU de Montpellier) ; Kaplanski Gilles (Service de Médecine Interne, Hôpital la Conception, Marseille) ; Lautrette Alexandre (Hôpital Gabriel Montpied, Service de Réanimation médicale, Clermont-Ferrand); Le Guern Véronique (Unité d'Hémaphrèse, Service de Médecine Interne, Hôpital Cochin, Paris) ; Loirat Chantal (Service de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Robert Debré, Paris); Moulin Bruno (Service de Néphrologie, Hôpital Civil, Strasbourg);

Mousson Christiane (Service de Néphrologie, CHU de Dijon); Ojeda Uribe Mario (Service d'Hématologie, Hôpital Emile Muller, Mulhouse); Ouchenir Abdelkader (Service de Réanimation, Hôpital Louis Pasteur, Le Coudray); Parquet Nathalie (Unité de Clinique Transfusionnelle, Hôpital Cochin, Paris); Peltier Julie (Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale, Hôpital Tenon, Paris) ; Pène Frédéric (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Cochin, Paris) ; Perez Pierre (Service de Réanimation polyvalente, CHU de Nancy); Poullin Pascale (Service d'hémaphrèse et d'autotransfusion, Hôpital la Conception, Marseille); Pouteil-Noble Claire (Service de Néphrologie, CHU Lyon-Sud, Lyon); Presne Claire (Service de Néphrologie, Hôpital Nord, Amiens); Provôt François (Service de Néphrologie, Hôpital Albert Calmette, Lille); Rondeau Eric (Urgences Néphrologiques et Transplantation Rénale, Hôpital Tenon, Paris); Saheb Samir (Unité d'Hémaphrèse, Hôpital la Pitié-Salpêtrière, Paris) ; Schlemmer Benoît (Service de Réanimation Médicale, Hôpital Saint-Louis, Paris); Seguin Amélie (Service de Réanimation Médicale, centre hospitalier de Vendée); Servais Aude (Service de Néphrologie, CHU Necker-Enfants Malades) ; Stépanian Alain (Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Lariboisière, Paris); Vernant Jean-Paul (Service d'Hématologie, Hôpital la Pitié-Salpêtrière, Paris); Veyradier Agnès (Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Lariboisière, Paris); Vigneau Cécile (Service de Néphrologie, Hôpital Pontchaillou, Rennes); Wynckel Alain (Service de Néphrologie, Hôpital Maison Blanche, Reims); and Zunic Patricia (Service d'Hématologie, Groupe Hospitalier Sud-Réunion, la Réunion).

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

NB performed the biological part of the study, collected clinical data, analyzed and interpreted the results, and wrote the manuscript. SB performed the technical/biological part of the study, analyzed the data, and critically reviewed the manuscript. BJ and AS supervised the biological study, interpreted the results, and critically reviewed the manuscript. SC and AD collected clinical data and critically reviewed the manuscript. PC supervised the patients' enrollment, codedesigned the study, and critically reviewed the manuscript. AV designed and supervised the global study, interpreted the results, and critically reviewed the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

#### RELATIONSHIP DISCLOSURE STATEMENT

PC is member of the advisory board for Sanofi, Takeda, Roche, and Alexion. AV is a member of the French advisory boards for Sanofi, Takeda, and Roche-Chugai. NB, SB, SC, AD, BJ, and AS declare no conflict of interest.

#### REFERENCES

1. 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;339:1578-84.
2. Sadler JE. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;130:1181-8.



3. Mariotte E, Azoulay E, Galicier L, Rondeau E, Zouiti F, Boisseau P, et al. The French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies. Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol*. 2016;3:237–45.
4. Tsai H-M, Lian EC. Antibodies to Von Willebrand factor–cleaving protease in acute TTP. *N Engl J Med*. 1998;339:1585–94.
5. 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;413:488–94.
6. 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;83:233–44.
7. 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*. 2014;54:389–97.
8. Scully M, Thomas M, Underwood M, Watson H, Langley K, Camilleri RS, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy: presentation, management, and subsequent pregnancy outcomes. *Blood*. 2014;124:211–20.
9. 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;119:5888–97.
10. Page EE, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, Vesely SK, George JN. Clinical importance of ADAMTS13 activity during remission in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2016;128:2175–8.
11. Joly BS, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2017;129:2836–46.
12. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, et al. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol*. 2012;158:323–35.
13. Bell WR, Ness PM, Kickler TS, Braine HG. Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura–hemolytic uremic syndrome: clinical experience in 108 patients. *N Engl J Med*. 1991;325:398–403.
14. Balduini CL, Gugliotta L, Luppi M, Laurenti L, Klersy C, Pieresca C, et al. High versus standard dose methylprednisolone in the acute phase of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a randomized study. *Ann Hematol*. 2010;89:591–6.
15. 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;40:104–11.
16. 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;118:1746–53.
17. Peyvandi F, Duby C. Caplacizumab, Anti-VWF nanobody potentially changing the treatment paradigm in thrombotic thrombocytopenic purpura: results of the TITAN trial. *Blood*. 2014;124:229.
18. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, Cataland S, Knöbl P, Wu H, et al. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 2016;374:511–22.
19. Scully M, Cataland SR, Peyvandi F, Coppo P, Knöbl P, Kremer Hovinga JA, et al. Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 2019;380:335–46.
20. 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.
21. 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;93:232–9.
22. Kremer Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lämmle B, George JN. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2010;115:1500–11.
23. Jin M, Casper TC, Cataland SR, Kennedy MS, Lin S, Li YJ, et al. Relationship between ADAMTS13 activity in clinical remission and the risk of TTP relapse. *Br J Haematol*. 2008;141:651–8.
24. Callewaert F, Ulrichs H, Kremer Hovinga JA, De Swert K, Tersago D. The predictive value of ADAMTS13 activity for treatment monitoring of patients with acquired TTP: data from the phase II TITAN trial with caplacizumab. *J Thromb Haemostasis*. 2015;13:24.
25. Studt JD, Böhaa M, Budde U, Girma JP, Varadi K, Lämmle B. Measurement of von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: a multicenter comparison of different assay methods. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1882–7.
26. Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, Mackie I, Scully MA, Machin SJ. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2010;8:631–40.
27. 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*. 2008;6:1534–41.
28. Remuzzi G, Galbusera M, Noris M, Canciani MT, Daina E, Bresin E, et al. Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2002;100:778–85.
29. 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;91:2839–46.
30. Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Lämmle B, Furlan M. Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF. A tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thromb Haemost*. 1999;82:1386–9.
31. Böhm M, Vigh T, Scharrer I. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor–cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Ann Hematol*. 2002;81:430–5.
32. Obert B, Tout H, Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D, Girma JP. Estimation of the von Willebrand factor–cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to vWF. *Thromb Haemost*. 1999;82:1382–5.
33. Joly BS, Stepanian A, Hajage D, Thouzeau S, Capdenat S, Coppo P, et al. Evaluation of a chromogenic commercial assay using VWF-73 peptide for ADAMTS13 activity measurement. *Thromb Res*. 2014;134:1074–80.
34. Mackie I, Langley K, Chitolie A, Liesner R, Scully M, Machin S, et al. Discrepancies between ADAMTS13 activity assays in patients with thrombotic microangiopathies. *Thromb Haemost*. 2013;109:488–96.
35. Thouzeau S, Capdenat S, Stepanian A, Coppo P, Veyradier A. Evaluation of a commercial assay for ADAMTS13 activity measurement. *Thromb Haemost*. 2013;110:852–3.
36. Jin M, Cataland S, Bissell M, Wu HM. A rapid test for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura using surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF)-mass spectrometry. *J Thromb Haemost*. 2006;4:333–8.

37. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETSS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol*. 2005;129:93–100.
38. Mirabet M, Blanch S, Puig J, Serra J. Highly sensitive fully automated chemiluminescent immunoassay for rapid quantification of ADAMTS13 activity. *Res Pract Thromb Haemost*. 2017;1:1297.
39. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y. Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion*. 2006;46:1444–52.
40. Valsecchi C, Mirabet M, Mancini I, Biganzoli M, Schiavone L, Faraudo S, et al. Evaluation of a new, rapid, fully automated assay for the measurement of ADAMTS13 activity. *Thromb Haemost*. 2019;119:1767–72.
41. Stratmann J, Ward JN, Miesbach W. Evaluation of a rapid turn-over, fully-automated ADAMTS13 activity assay: a method comparison study. *J Thromb Thrombolysis*. 2020;50(3):628–31.
42. Favresse J, Lardinois B, Chatelain B, Jacqmin H, Mullier F. Evaluation of the fully automated HemosIL Acustar ADAMTS13 Activity assay. *Thromb Haemost*. 2018;118:942–4.
43. Joly BS, Stepanian A, Leblanc T, Hajage D, Chambost H, Harambat J, et al. The French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies. Child-onset and adolescent-onset acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with severe ADAMTS13 deficiency : a cohort study of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol*. 2016;3026:1–10.
44. Hubbard AR, Heath AB, Kremer Hovinga JA. Establishment of the WHO 1st International Standard ADAMTS13, plasma (12/252): Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*. 2015;13:1151–3.
45. Lu RN, Yang S, Wu HM, Zheng XL. Unconjugated bilirubin inhibits proteolytic cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS13 protease. *J Thromb Haemost*. 2015;13:1064–72.
46. Benhamou Y, Assie C, Boelle P-Y, Buffet M, Grillberger R, Malot S, et al. 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.
47. Bendapudi PK, Li A, Hamdan A, Fry AM, Uhl L, Marques M, et al. Derivation and prospective validation of a predictive score for the rapid diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura: the Plasmic score. *Blood*. 2014;124:231.
48. Connell NT, Cheves T, Sweeney JD. Effect of ADAMTS13 activity turnaround time on plasma utilization for suspected thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*. 2016;56:354–9.
49. Crawley JTB, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood*. 2005;105:1085–93.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Beranger N, Benghezal S, Joly BS, et al. Diagnosis and follow-up of thrombotic thrombocytopenic purpura with an automated chemiluminescent ADAMTS13 activity immunoassay. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021;5: 81–93. <https://doi.org/10.1002/rth2.12461>

## ***Supplementary data***

### **Automated chemiluminescent ADAMTS13 activity immunoassay for thrombotic thrombocytopenic purpura diagnosis and follow-up**

#### **Evaluation of an automated ADAMTS13 activity assay**

Nicolas BERANGER\*<sup>1,2</sup>, Sandrine BENGHEZAL\*<sup>1,2</sup>, Bérangère S. JOLY<sup>1,2</sup>, Sophie CAPDENAT<sup>1,2</sup>, Adeline DELTON<sup>1,2</sup>, Alain STEPANIAN<sup>1,2</sup>, Paul COPPO<sup>2,3</sup>, Agnès VEYRADIER<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Service d'hématologie biologique, Hôpital Lariboisière, AP-HP.Nord and EA3518 Institut de Recherche Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

<sup>2</sup> French National Reference Centre for Thrombotic Microangiopathies, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

<sup>3</sup> Département d'hématologie clinique, Hôpital Saint Antoine, AP-HP.6, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

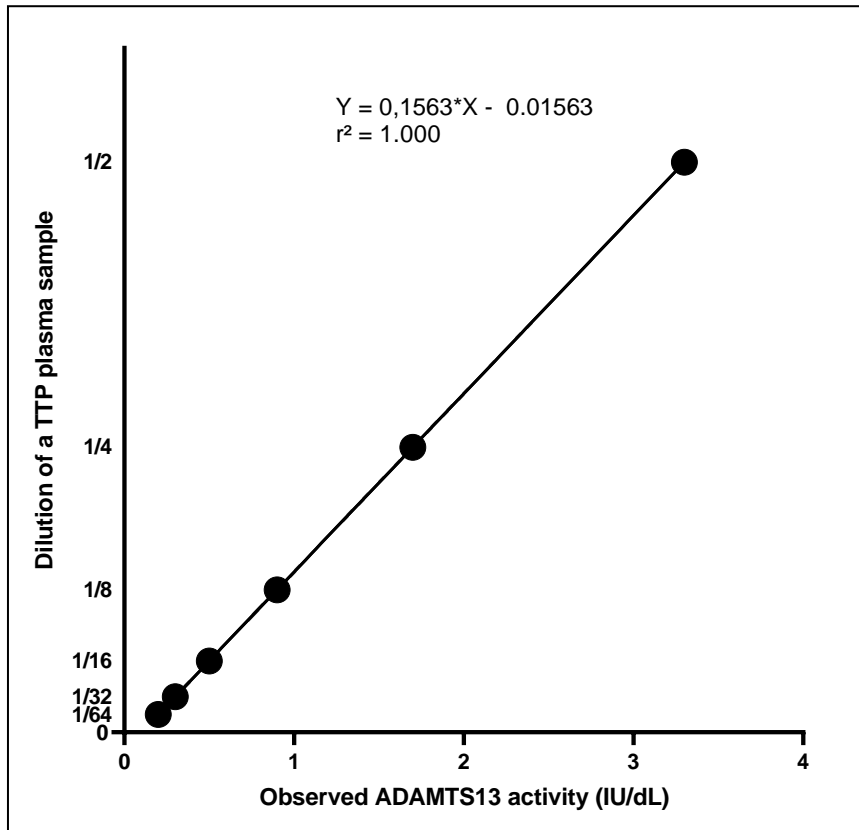
\*N. Béranger and S. Benghezal contributed equally to this paper.

***1 suppl. table and 4 suppl. figures***

**Suppl. Table 1. Specific features of the eleven “autofluorescent” plasma samples by FRET5-VWF73 assay which ADAMTS13 activity was assessed using the Technozym® ADAMTS13 activity ELISA.**

| <b>Patient</b> | <b>ADAMTS13 Activity<br/>(Technozym® ADAMTS13<br/>activity ELISA) (IU/dL)</b> | <b>ADAMTS13 Activity<br/>(HemosIL® AcuStar ADAMTS13<br/>activity assay) (IU/dL)</b> | <b>Clinical context</b>                     |
|----------------|---|---|---|
| <b>1</b>       | 67  | 51  | TMA   |
| <b>2</b>       | 72  | 60  | TMA, dialysis-requiring acute kidney injury |
| <b>3</b>       | 74  | 80  | TMA, dialysis-requiring acute kidney injury |
| <b>4</b>       | 43  | 17  | TMA, hemophagocytic lymphohistiocytosis     |
| <b>5</b>       | 43  | 40  | TMA, alcoholic liver disease                |
| <b>6</b>       | 57  | 34  | TMA, kidney transplantation                 |
| <b>7</b>       | 46  | 37  | TMA, kidney transplantation                 |
| <b>8</b>       | 54  | 34  | TMA, folate and vitamin B12 deficiency      |
| <b>9</b>       | 80  | 52  | TMA, systemic lupus erythematosys           |
| <b>10</b>      | 68  | 54  | Remission of aTTP (idiopathic form)         |
| <b>11</b>      | 45  | 38  | Remission of aTTP (idiopathic form)         |

TMA : Thrombotic microangiopathy ; aTTP : acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.

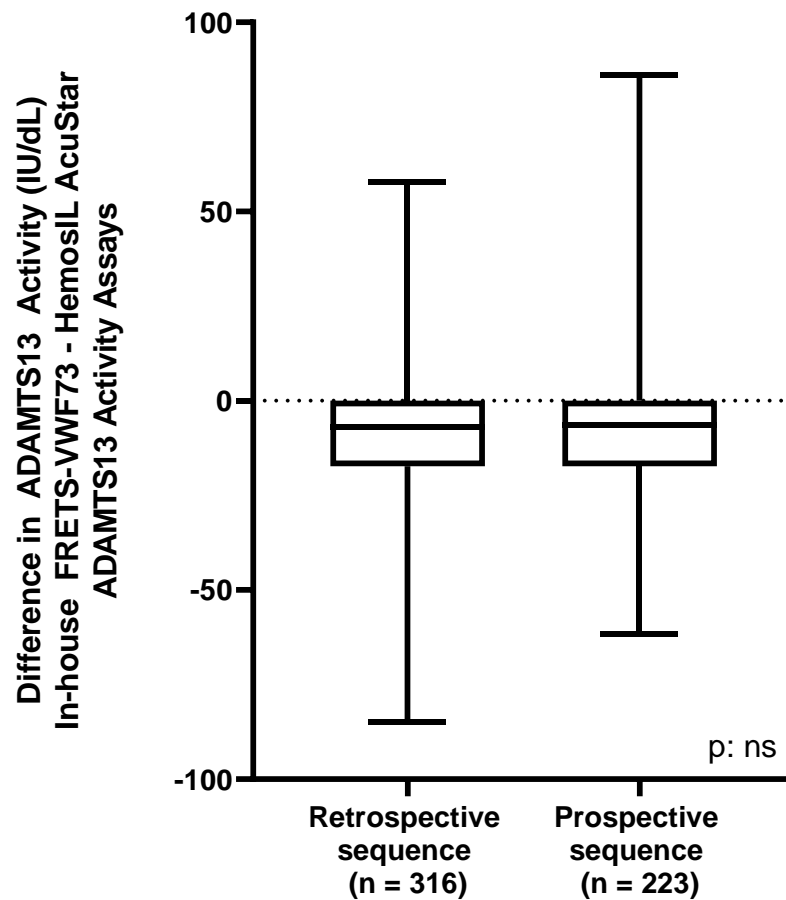


**Suppl. Figure 1. Determination of linearity and limit of detection of the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay.**

aTTP: acquired thrombotic thrombocytopenic purpura.

Limit of detection and linearity were determined by serial dilutions of a known TTP plasma sample (ADAMTS13 activity < 10 IU/dL by FRETs-VWF73 assay) in a normal plasma previously heated at 56°C for 2 hours, therefore devoid of ADAMTS13 activity (tested < 0.2 IU/dL). Limit of detection was determined at 0.2 IU/dL, matching the manufacturer's claim. No background signal was detected when assessing the ADAMTS13 activity of the heated plasma. Linearity was assessed by serial dilutions of an aTTP plasma sample. Pearson's correlation coefficient  $r^2$  was 1.00





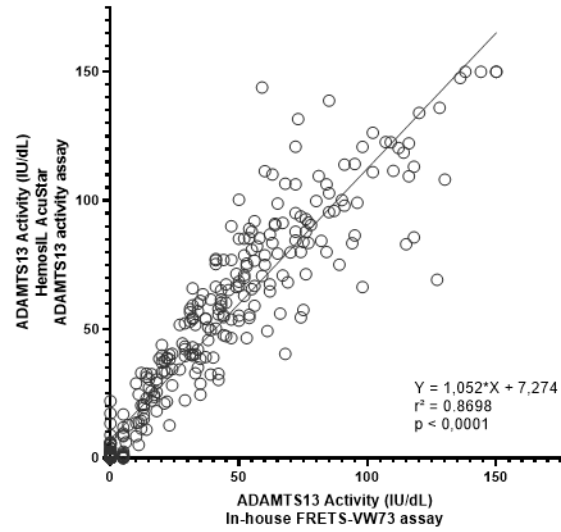
**Suppl. Figure 2. Box plots of differences between ADAMTS13 activity assessed by our in-house FRET5-VWF73 and the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assays for the retrospective sequence (n = 316 samples) and the prospective sequence (n = 223 samples).**

ns: not significant

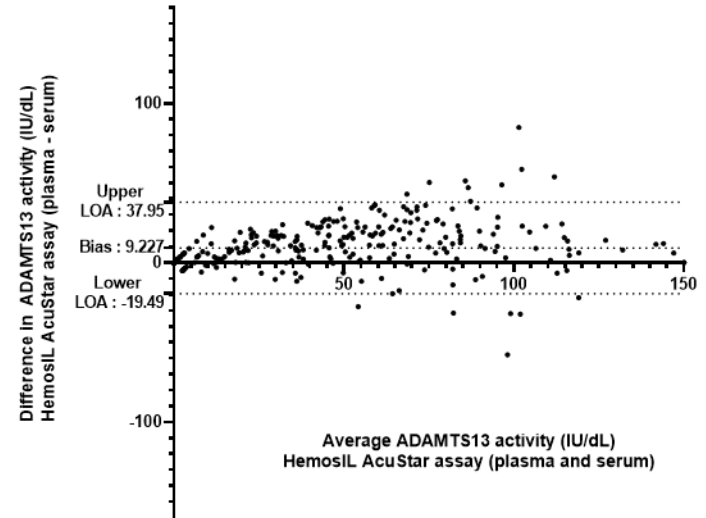
These box plots display for each sequence the minimum, the first quartile, the median, the third quartile and the maximum data points. The means of differences between ADAMTS13 activity measured by our in-house FRET5-VWF73 assay and the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay between the two sequences of our study were compared with a Mann Whitney U test, and no significant difference was observed (p: not significant).

Supp. Fig. 3

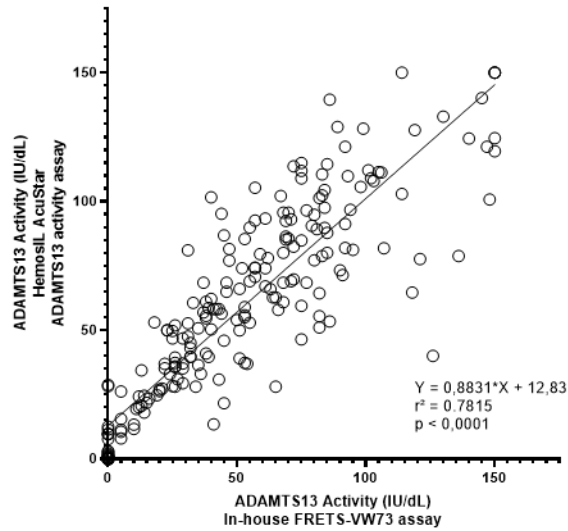
A.



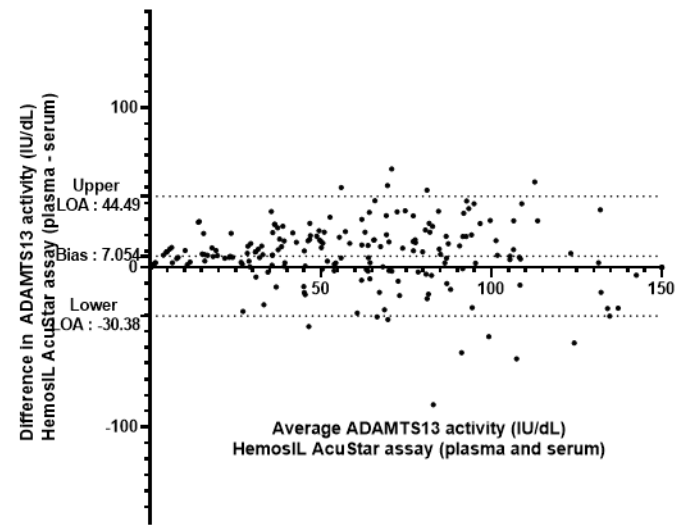
B.



C.

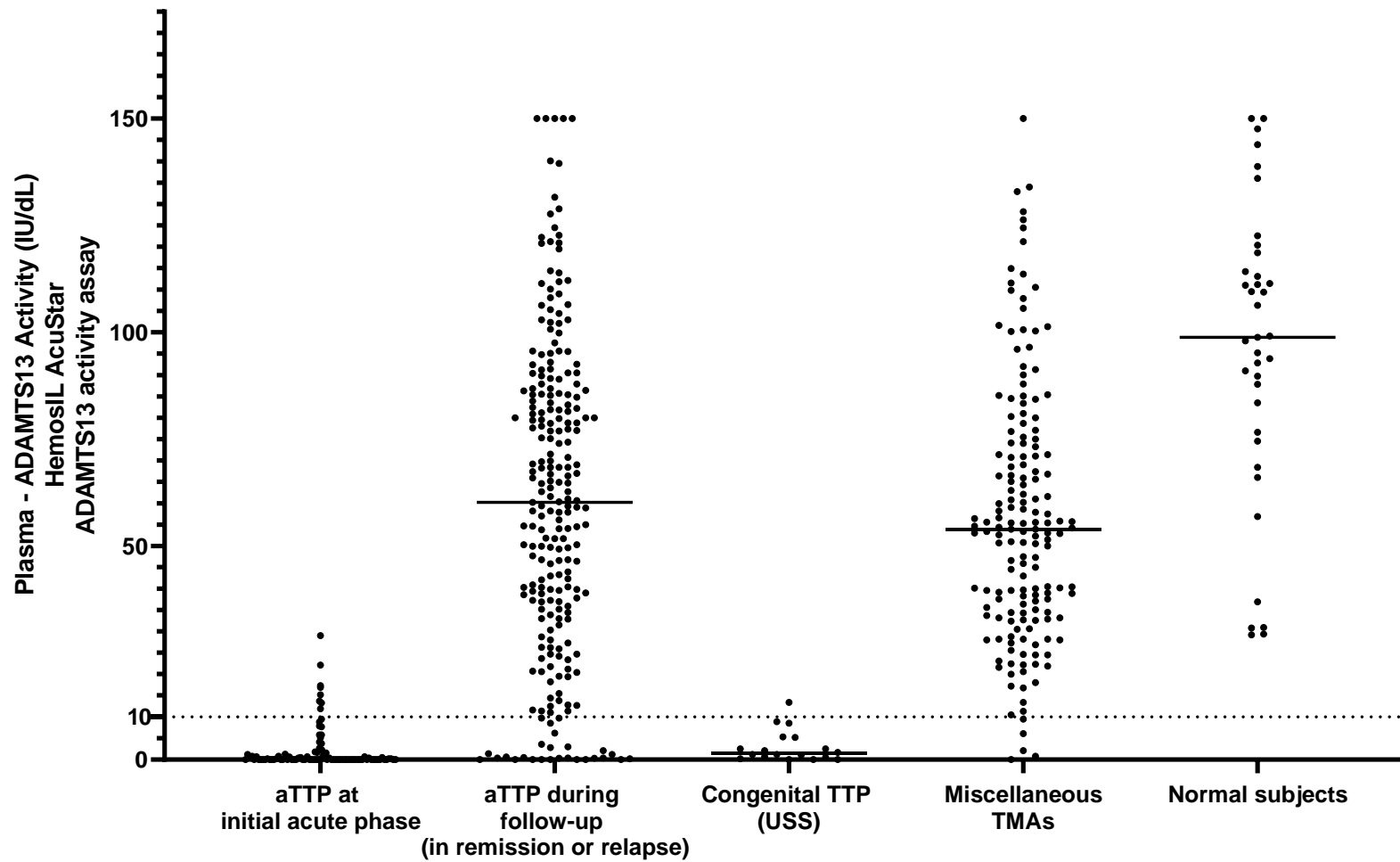


D.



**Suppl. Figure 3. Scattered diagram and Bland-Altman plot illustrating the comparison of in-house FRET5-VWF73 assay (reference method) and HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay (evaluated method) for the measurement of ADAMTS13 activity for the retrospective evaluation (n = 316 samples) (A and B) and the prospective evaluation (n = 223 samples) (C and D).**

For the statistical analysis, values were respectively set to 5 IU/dL and 0 IU/dL if ADAMTS13 activity was determined <10 IU/dL with a detectable RFU and <5 IU/dL with our in-house FRET5-VWF73. On the scattered diagrams, each sample is represented as a circle. Pearson's correlation coefficient ( $r^2$ ) was found at 0.8698 and at 0.7815 (in both cases  $p < 0.0001$ ), and fitted regression line were  $Y = 1.052X + 7.274$  and  $Y = 0.8831X + 12.83$ , respectively. The Bland-Altman plot illustrates the comparison of the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay to our in-house FRET5-VWF73 assay for each sequence of our study. Each sample is represented by a dot. In both cases, the results illustrate an overall tendency of the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay to overestimate ADAMTS13 activity compared to our in-house FRET5-VWF73 assay (mean bias was respectively, 9.227 IU/dL for the retrospective sequence and 7.054 IU/dL for the prospective sequence). Limits of agreement (respectively [-19.49 IU/dL; +37.95 IU/dL] and [-30.38 IU/dL; +44.49 IU/dL] illustrate the shared variability between both assays in the measurement of ADAMTS13 activity in both sequences.



Suppl. Figure 4. Box plots illustrating the distribution of 539 citrated plasma samples tested as a function of ADAMTS13 activity assessed by the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay and of clinical context.

aTTP: acquired auto-immune thrombotic thrombocytopenic purpura; USS: Upshaw-Schulman Syndrome; TMA: thrombotic microangiopathy

La mesure de l'activité d'ADAMTS13 par la technique HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity assay est donc une alternative tout à satisfaisante aux autres méthodes commerciales. Sa réalisation sur un automate relativement répandu dans les laboratoires d'hémostase ne nécessite pas d'expertise technique particulière, ce qui pourrait notamment permettre une disponibilité en urgence de mesure de l'activité d'ADAMTS13 au moins en exercice hospitalier de jour (hors période de garde où les automates de biologie spécialisée comme l'AcuStar® ne sont généralement pas fonctionnels). Enfin, cette technique permet de s'affranchir de l'interférence analytique majeure du FRETTS-VWF73 qu'est l'auto-fluorescence.

Plusieurs limites sont toutefois à souligner. En 2022, le prix unitaire de chaque test de mesure de l'activité d'ADAMTS13 par HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity assay (au moins neuf fois le prix du FRETTS-VWF73 en termes de réactifs) est un frein réel à son utilisation par plusieurs centres. Par ailleurs, les cas de discordance diagnostiques par rapport au FRETTS-VWF73 révélés par notre évaluation soulignent l'importance de la validation biologique par du personnel qualifié. Par ailleurs, les éventuels aléas liés à la production industrielle des réactifs par un seul fournisseur (lots défectueux, retard de commande ...) doivent également être envisagés. La nécessité de conserver les méthodes de référence dans des laboratoires référents apparaît donc incontournable, tant pour clarifier des situations dont le diagnostic est difficile que pour sécuriser une continuité des soins.

Un autre point d'intérêt de notre étude concerne le PTT en contexte obstétrical. L'intérêt d'une méthode de mesure de l'activité d'ADAMTS13 disponible rapidement est évident dans le contexte d'une MAT obstétricale. Toutefois, l'identification de cinq discordances d'identification d'une activité d'ADAMTS13 effondrée (quatre sous-diagnostics de PTT et un surdiagnostic de PTT) questionne quant à cette sous-population spécifique et doit faire l'objet d'une évaluation complémentaire.

## **II. Purpura thrombotique thrombocytopénique en contexte obstétrical : étude du registre français du Centre National de Référence des Microangiopathies Thrombotiques (1999-2020)**

### **Troisième publication**

**Epidemiology, clinical presentation, management and follow-up of pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura: a cross sectional study of the registry of the French National Reference Center for Thrombotic MicroAngiopathies (1999-2020)**

En cours de soumission

Nicolas Béranger<sup>1,2</sup>, Paul Coppo<sup>3</sup>, Vassilis Tsatsaris<sup>4,5</sup>, Pierre Boisseau<sup>6</sup>, François Provot<sup>7</sup>, Yahsou Delmas<sup>8</sup>, Pascale Poullin<sup>9</sup>, Alain Stepanian<sup>1,2</sup>, Karen Vanhoorelbeke<sup>10</sup> Agnès Veyradier<sup>1,2</sup>, Bérangère Joly<sup>1,2</sup>

1 Service d'Hématologie biologique, CRMR des MAT-laboratoire ADAMTS13, FSMR MaRIH, CRMR de la maladie de Willebrand, FSMR MHEMO, DMU BioGeM, Hôpital Lariboisière, AP-HP.Nord, Université Paris Cité, Paris, France

2 EA-3518 Recherche clinique en hématologie, immunologie et transplantation, Groupe MicroAngiopathies Thrombotiques, VWF et ADAMTS13, Institut de Recherche Saint Louis - Université Paris Cité, Paris, France

3 Service d'Hématologie, Centre de référence des microangiopathies thrombotiques (CNR-MAT), DMU ORPHé, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP.Sorbonne Université, Paris, France

4 Maternité Port Royal, Hôpital Cochin, AP-HP. Centre – Université Paris Cité, Paris, France

5 Inserm UMR-S 1139, Physiopathologie et pharmacotoxicologie placentaire humaine, Université Paris Cité, Paris, France

6 Service de génétique, CHU de Nantes, Nantes, France

7 Service de néphrologie, CHRU de Lille, Lille, France

8 Service de néphrologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

9 Service d'hémaphérèse, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France

10 Laboratory for Thrombosis Research, Interdisciplinary Research Facility Life Sciences, Katholieke Universiteit Leuven Campus Kulak Kortrijk, Kortrijk, Belgium

Les études internationales dédiées aux cohortes de PTT obstétrical ne concernent qu'un nombre relativement faible de patientes (cohortes d'effectifs < 100) et se limitent le plus souvent à une étude ciblée sur la phase aiguë du PTT sans documentation du suivi<sup>131,138,145,155,339,350</sup>. Ce travail de recherche clinique translationnel est une étude rétrospective multicentrique consacrée à l'étude des patientes atteintes de PTT inaugural en contexte obstétrical du registre français du CNR-MAT de 2000 à 2020, de la présentation clinique inaugurale au suivi des grossesses ultérieures. Le volet épidémiologique est complété par l'exploration des mécanismes physiopathologiques sous-jacents grâce à l'étude de biomarqueurs innovants dans ce contexte : mesure de l'activité d'ADAMTS13 par chimiluminescence, étude de la conformation d'ADAMTS13, étude du ratio sFlt-1/PIGF classiquement utilisé dans le dépistage et le diagnostic de pré-éclampsie<sup>313</sup>.

Du 1<sup>er</sup> janvier 2000 au 31 décembre 2020, 1174 patientes atteintes de MAT en contexte obstétrical (incluant une grossesse en cours, le post-partum ou les suites d'une interruption volontaire de grossesse) ont été prospectivement incluses dans le registre du CNR-MAT. L'exploration biologique d'ADAMTS13 a permis d'identifier 108 patientes atteintes de PTT (activité d'ADAMTS13 effondrée, < 10 UI/dL). Sur la même période de temps, un total de 567 PTT ont été diagnostiqués chez des femmes en âge de procréer (18 à 45 ans), qu'elles soient enceintes ou non. La proportion de PTT en contexte obstétrical parmi les femmes en âge de procréer est donc de 19% (108/567).

Une investigation biologique approfondie a permis de séparer ces 108 patientes en trois sous-groupes distincts : 52 PTTi (52/108, 48,1% ; définis par la présence d'IgG anti-ADAMTS13 à un titre significatif), 27 PTT acquis de mécanisme indéterminé (PTTu) (27/108, 25% ; définis par un PTT acquis en l'absence d'IgG anti-ADAMTS13 à un titre significatif) et 29 PTTc (29/108, 26,9% ; définis par la présence de mutations bi-alléliques délétères du gène *ADAMTS13*). L'âge médian est de 28 ans (17 – 44 ans) et la majorité des patientes sont primigestes (64/108, 59,3%). Près des deux-tiers des patientes (72/108, 67%) n'avaient pas d'autre contexte clinique associé ; toutefois, nous rapportons des PTT obstétricaux compliqués d'une maladie auto-immune (18/108, 16,7%) ou d'une infection (17/108, 15,7%). Cinq PTT obstétricaux ont été diagnostiqués dans les suites d'une procréation médicalement assistée (2 stimulations ovariennes, 2 fécondations *in vitro*, 1 non précisée, 5/108, 4,6%) et deux dans les suites d'une interruption volontaire de grossesse (2/108, 1,9%).

Le terme médian de diagnostic de PTT est de 30 SA (5SA – 4 semaines en post-partum). Treize PTT (13/108, 12%) ont été diagnostiqués au cours du 1<sup>er</sup> trimestre (dont 2 PTT dans les suites d'une interruption volontaire de grossesse), 25 PTT (25/108, 23,1%) ont été diagnostiqués au cours du 2<sup>ème</sup> trimestre, 53 PTT (53/108, 49,1%) ont été diagnostiqués au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre de grossesse et 17 PTT (17/108, 9,9%) ont été diagnostiqués au cours du post-partum.

La survie maternelle est de 95% (103/108, 95%) et la survie fœtale globale est de 75,5% (80/106, après exclusion des 2 interruptions volontaires de grossesse). La survie fœtale est fortement associée au terme de la grossesse où le PTT survient, et est particulièrement faible au 2<sup>ème</sup> trimestre (6/25, 24% de survie) très majoritairement par MFIU, et dans une moindre mesure au 1<sup>er</sup> trimestre (6/11, 54,5% de

survie). A l'inverse, la survie fœtale est bien meilleure à partir du troisième trimestre (48/53, 90,6% de survie). L'examen anatomopathologique des placentas révèle de façon récurrente la présence d'une ischémie placentaire sévère avec de nombreux thrombi intervillositaires, conduisant probablement à une hypoperfusion placentaire responsable de morbi-mortalité fœtale (RCIU, MFIU). Si l'association d'un ratio sFlt-1/PIGF élevé à la phase aiguë d'un PTTc de révélation obstétricale a déjà été rapportée dans un case-report<sup>351</sup>, nous documentons pour la première fois le ratio sFlt-1/PIGF dans une cohorte de PTT obstétricaux. Le ratio sFlt-1/PIGF a été mesuré chez 71 patientes (36 PTTi, 16 PTTu et 19 PTTc) et comparé au seuil spécifique selon le terme de la grossesse (85 avant 34SA et 110 après 34SA). De façon surprenante, près de la moitié des patientes dont la phase inaugurale de PTT a eu lieu avant 34SA présente un ratio sFlt-1/PIGF supérieur à 85 (13/23 PTTi, 2/5 PTTu et 6/15 PTTc soit 21/43 patients, 48,8%). Parmi les patientes dont la phase inaugurale de PTT s'est déclenchée après 34SA, 5 présentent un ratio sFlt-1/PIGF > 110 (2/13 PTTi, 3/11 PTTu et aucune des 4 PTTc soit 5/28, 17,8%). La documentation d'une proportion élevée de patientes PTT ayant un ratio sFlt-1/PIGF élevé est un argument supplémentaire à la dysfonction trophoblastique et à l'atteinte endothéliale, mimant ce qui est observé dans la pré-éclampsie. Par ailleurs, un ratio sFlt-1/PIGF élevé est indépendant du mécanisme du déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 (PTTi, PTTu ou PTTc). Notre étude confirme la superposition clinico-biologique pouvant exister entre deux MAT obstétricales, PTT et pré-éclampsie, et suggère donc que la spécificité d'un ratio sFlt-1/PIGF élevé pour le diagnostic de pré-éclampsie peut être prise en défaut dans le contexte du PTT obstétrical. En d'autres termes, un ratio sFlt-1/PIGF élevé ne permet en aucun cas d'exclure formellement un diagnostic de PTT.

L'entité la plus fréquemment retrouvée dans notre cohorte de PTT obstétricaux est le PTTi (près de 50% des patientes). Le PTTi obstétrical présente des caractéristiques superposables au PTTi idiopathique : activité d'ADAMTS13 effondrée (par la méthode de référence FRETs-VWF73 comme par méthode chimiluminescente HemosIL® AcuStar), antigène d'ADAMTS13 très diminué, présence d'IgG anti-ADAMTS13 à un titre significatif et conformation d'ADAMTS13 ouverte. La prise en charge thérapeutique repose de façon quasi-constante sur les EP au PFC, en association avec des traitements immunosuppresseurs. Si les corticoïdes ne sont pas contre-indiqués au cours de la grossesse, l'utilisation du rituximab, bien qu'autorisée, reste discutée au cas par cas et son initiation est le plus souvent instaurée après extraction fœtale. Nous rapportons toutefois les cas de trois patientes traitées par rituximab avant extraction fœtale, conduisant à trois naissances d'enfants en bonne santé et sans effet secondaire. Nous rapportons également les cas de quatre patientes pour lesquelles un traitement par caplacizumab a été initié après extraction fœtale. Aucun effet indésirable hémorragique n'a été rapporté chez ces patientes. Le manque de recul de cette thérapie en contexte obstétrical impose néanmoins la plus grande prudence.

Le suivi de ces patientes révèle un risque de rechute pouvant survenir indépendamment d'une future grossesse (11/48 patientes survivantes soit 22,9% des patientes), soulignant la nécessité d'une surveillance clinico-biologique au long cours. Vingt-et-une grossesses sont rapportées au cours du suivi de ces patientes, dont 3 sont marquées par une rechute de PTT : l'activité d'ADAMTS13 mesurée au début de ces 3 grossesses est soit indétectable (<10 UI/dL) soit très diminuée mais détectable (12



UI/dL). Une grossesse compliquée d'une pré-éclampsie est également rapportée, associée à une activité d'ADAMTS13 très diminuée mais détectable (16 UI/dL). A l'inverse, les patientes pour lesquelles l'activité d'ADAMTS13 est normale ou normalisée par traitement pré-emptif par rituximab au début de la grossesse n'ont pas rechuté, confirmant les observations internationales liant l'activité d'ADAMTS13 en début de grossesse avec le risque de rechute.

Le groupe de PTTc de révélation obstétricale que nous rapportons est également concordant avec la littérature internationale. L'épisode inaugural de PTT survient à l'occasion de la première grossesse et il est associé à une activité d'ADAMTS13 effondrée par la méthode de référence FRETS-VWF73 mais parfois détectable avec la méthode chimiluminescente HemosIL® AcuStar, un antigène d'ADAMTS13 très diminué, l'absence d'IgG anti-ADAMTS13, une conformation d'ADAMTS13 fermée, et par définition la présence de mutations délétères du gène *ADAMTS13*. La documentation d'activité d'ADAMTS13 très diminuée mais détectable par méthode chimiluminescente soulève le risque d'une exclusion erronée de PTT et doit imposer une certaine prudence, voire un contrôle systématique de l'activité d'ADAMTS13 par méthode de référence. La mutation R1060W est de loin la plus fréquente (72,4% des patientes) et se traduit par une rétention intra-cellulaire sévère d'ADAMTS13<sup>352</sup>. La persistance pendant plusieurs mois de taux de VWF élevés inhérente au contexte obstétrical semble être un facteur nécessaire et suffisant pour déclencher une poussée de PTT. Cette notion est renforcée par le suivi des patientes car aucune rechute en dehors d'une nouvelle grossesse n'est rapportée. Sur 18 nouvelles grossesses surveillées, 14 ont été encadrées par une plasmathérapie prophylactique, 3 ont été menées sans surveillance médicale (i.e. sans plasmathérapie prophylactique) et 1 patiente a choisi d'interrompre sa grossesse. Parmi les 14 grossesses encadrées par plasmathérapie prophylactique, une seule rechute de PTT a été rapportée. A l'inverse, les 3 grossesses menées sans plasmathérapie prophylactique ont toutes été marquées par une rechute de PTT, avec 2 MFIU. Ces résultats renforcent l'importance d'une surveillance clinico-biologique et d'une plasmathérapie prophylactique pour limiter le risque de rechute à l'occasion d'une nouvelle grossesse chez les patientes atteintes de PTTc.

Enfin, notre équipe décrit pour la première fois une entité particulière de PTTu et représentant un quart de notre cohorte de PTT inaugural en contexte obstétrical. La présentation clinico-biologique de ces patientes diffère des PTTi et des PTTc. Au diagnostic, les patientes présentent fréquemment une hypertension artérielle et une atteinte rénale, une activité d'ADAMTS13 effondrée avec la méthode FRETS-VWF73 mais souvent détectable par chimiluminescence (jusqu'à 30 UI/dL), l'absence d'IgG anti-ADAMTS13 et, de façon surprenante, une conformation d'ADAMTS13 très majoritairement ouverte (77,8%). Le risque d'exclusion erronée de PTT sur la base d'une activité d'ADAMTS13 supérieure à 10 UI/dL avec la méthode chimiluminescente est un point d'alerte qui doit une nouvelle fois imposer un contrôle de l'activité d'ADAMTS13 par une méthode de référence. La grande fréquence d'une conformation d'ADAMTS13 ouverte est un résultat surprenant à deux égards. D'une part, une conformation d'ADAMTS13 ouverte est classiquement associée de façon spécifique au PTTi idiopathique. D'autre part, l'étude dédiée au PTTu de notre équipe montre une conformation d'ADAMTS13 fermée à la phase aiguë du PTT<sup>207</sup>. Toutefois, la grossesse est un critère d'exclusion dans cette étude, ce qui peut expliquer cette apparente contradiction et plusieurs hypothèses

physiopathologiques peuvent être évoquées. Une ouverture d'ADAMTS13 pourrait être due aux taux élevés et persistants du VWF observés en contexte obstétrical. L'ouverture d'ADAMTS13 entraînant, en l'absence d'inhibition du site catalytique par des auto-anticorps anti-ADAMTS13, une activité intrinsèque augmentée de cette métalloprotéase, cette hypothèse permet d'expliquer la proportion relativement élevée (15/27, 55,6%) de patientes atteintes de PTTu pour lesquelles l'activité d'ADAMTS13 est détectable par la méthode chimiluminescente. La combinaison d'une consommation d'ADAMTS13 entraînant un déficit quantitatif sévère et d'une dégradation d'ADAMTS13 exposant l'épitope cryptique de l'anticorps 1C4 (et donc une conformation d'ADAMTS13 mesurée ouverte), est une autre hypothèse à envisager<sup>99</sup>. Enfin, la possibilité de PTTi mal étiquetés à cause d'une recherche d'IgG anti-ADAMTS13 faussement négative doit être évoquée. Ces hypothèses n'expliquent toutefois pas clairement le nombre important de discordance entre la méthode de référence FRETs-VWF73 et la méthode chimiluminescente HemosIL® AcuStar. La différence de présentation du substrat VWF73 entre les deux techniques (phase liquide pour le FRETs-VWF73 et *coating* sur les particules magnétiques pour l'HemosIL® Acustar) et donc d'accessibilité du pont peptidique (site de clivage du VWF) explique peut-être la grande sensibilité de la méthode HemosIL® AcuStar pour détecter des activités d'ADAMTS13 comprises entre 10 et 30 UI/dL. La proportion importante de patientes n'ayant pas eu besoin de PFC (29,7%) ou de rituximab (96,3%) pour entrer en rémission renforce l'hypothèse d'un mécanisme différent du PTTi. De plus, cette hypothèse est encore consolidée par la très faible proportion de rechute observée en dehors d'une grossesse (1/26, 3,8%) et l'absence de rechute observée lors des grossesses surveillées (0/3).

# **Epidemiology, clinical presentation, management and follow-up of pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura: a cross sectional study of the registry of the French National Reference Center for Thrombotic MicroAngiopathies (1999-2020)**

## **Pregnancy-onset TTP: the French experience**

Nicolas Béranger<sup>1,2</sup>, Paul Coppo<sup>3</sup>, Vassilis Tsatsaris<sup>4,5</sup>, Pierre Boisseau<sup>6</sup>, François Provot<sup>7</sup>, Yahsou Delmas<sup>8</sup>, Pascale Poullin<sup>9</sup>, Alain Stepanian<sup>1,2</sup>, Karen Vanhoorelbeke<sup>10</sup> Agnès Veyradier<sup>1,2</sup>, Bérandère S Joly<sup>1,2</sup>

1 Service d'Hématologie biologique, CRMR des MAT-laboratoire ADAMTS13, FSMR MaRIH, CRMR de la maladie de Willebrand, FSMR MHEMO, DMU BioGeM, Hôpital Lariboisière, AP-HP.Nord, Université Paris Cité, Paris, France

2 EA-3518 Recherche clinique en hématologie, immunologie et transplantation, Groupe MicroAngiopathies Thrombotiques, VWF et ADAMTS13, Institut de Recherche Saint Louis - Université Paris Cité, Paris, France;

3 Service d'Hématologie, Centre de référence des microangiopathies thrombotiques (CNR-MAT), DMU ORPHé, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP.Sorbonne Université, Paris, France

4 Maternité Port Royal, Hôpital Cochin, AP-HP. Centre – Université Paris Cité, Paris, France.

5 Inserm UMR-S 1139, Physiopathologie et pharmacotoxicologie placentaire humaine, Université de Paris, Paris, France

6 Service de génétique, CHU de Nantes, Nantes, France

7 Service de néphrologie, CHRU de Lille, Lille, France

8 Service de néphrologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

9 Service d'hémaphérese, Hôpital de la Conception, AP-HM, Marseille, France

10 Laboratory for Thrombosis Research, Interdisciplinary Research Facility Life Sciences, Katholieke Universiteit Leuven Campus Kulak Kortrijk, Kortrijk, Belgium

### *Corresponding author:*

Professor Agnès Veyradier, MD, PhD

Service d'Hématologie biologique

Hôpital Lariboisière

2, rue Ambroise Paré

75010 Paris

France

Tel: +33 1 49 95 64 11

Fax: +33 1 49 95 81 81

Email: [agnes.veyradier@aphp.fr](mailto:agnes.veyradier@aphp.fr)

*Summary 252 words*

*Text 5639 words*

*54 references*

*3 Tables and 5 Figures*

*1 suppl. Table and 1 suppl. Figure*

## Essentials

- . Three distinct entities of pregnancy-onset TTP, with different mechanisms, clinical features and outcomes, are singled out: immune TTP (iTTP), acquired TTP of unidentified mechanism (uTTP) and congenital TTP (cTTP)
- . Fetal outcome is closely linked to gestational age at acute phase of TTP
- . In the context of pregnancy, most iTTP and uTTP are shown to have open ADAMTS13 conformation at acute phase.
- . Subsequent pregnancies need specific management involving experienced multidisciplinary team and personalized counseling.

## Abstract

Pregnancy onset-thrombotic thrombocytopenic purpura is a life-threatening disease which diagnosis and management requires experienced multidisciplinary teams. This retrospective multicentric study from the national registry of the French Reference Center for Thrombotic Microangiopathies (TMA) from 2000 to 2020 focuses on diagnosis, clinical features, management and follow-up as well as novel ADAMTS13 assays (chemiluminescent ADAMTS13 activity, ADAMTS13 conformation) and sFlt-1/PlGF ratio to characterize this form of TTP. Among 1174 pregnancy-onset TMA, we identified 108 pregnancy-onset TTP : 52 immune TTP (iTTP, 52/108, 48.1%), 27 acquired TTP of unidentified mechanism (uTTP, 27/108, 25%) and 29 congenital TTP (cTTP, 29/108, 26.9%). Maternal outcome is excellent (survival rate 95%) and fetal outcome is linked to the pregnancy-term (survival rate 75.5%). sFlt-1/PlGF ratio were measured for the first time in pregnancy-onset TTP and could partially reflect the placental hypoperfusion leading to fetal death. Three distinct entities with different natural histories emerge. Pregnancy-onset immune TTP caused by anti-ADAMTS13 autoantibodies appears similar to idiopathic iTTP, with an open ADAMTS13 conformation and undetectable chemiluminescent ADAMTS13 activity, and is marked by relapse risk independent of subsequent pregnancies. Pregnancy-onset uTTP appears to have a different pathophysiology with an unexpected open ADAMTS13 conformation, higher chemiluminescent ADAMTS13 activity levels and a very low relapse risk independent of subsequent pregnancies. Finally, pregnancy onset cTTP is characterized by the necessity of pregnancy as a TTP trigger and a need for prophylactic plasmapheresis for subsequent pregnancies. This study was registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (number NCT00426686) and at the Health Authority and the French Ministry of Health (number P051064/PHRC AOM05012).

**Key words:** Pregnancy, ADAMTS13 protein, Thrombotic Microangiopathy, Thrombotic thrombocytopenic purpura

## Introduction

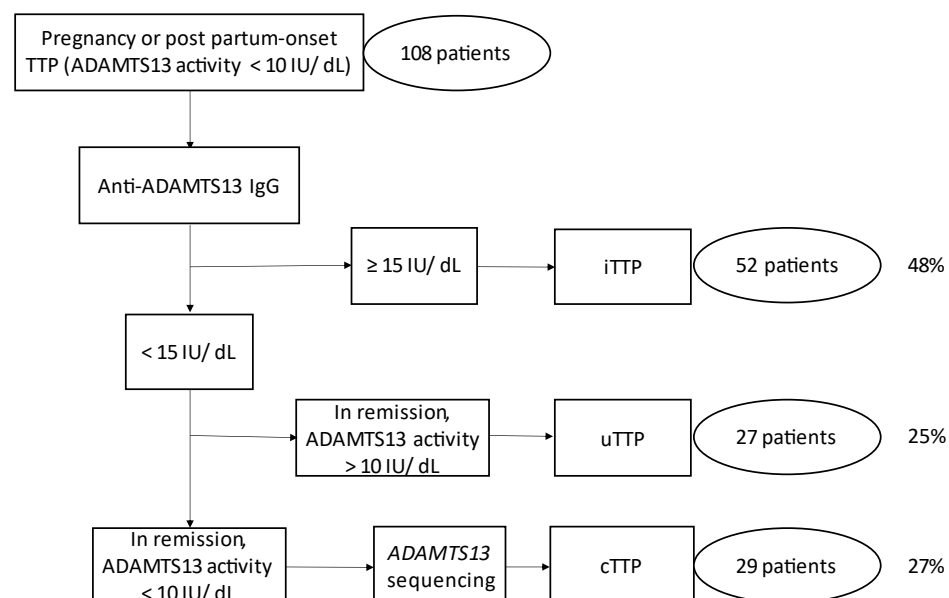
ADAMTS13 is a metalloprotein that specifically regulates the size of von Willebrand factor (VWF) through shear-stress related cleavage of its high molecular weight multimers. ADAMTS13 is a large multi-domain protein composed of a metalloprotease domain, a disintegrin domain, eight thrombospondin type-1 repeats (TSP1-8), a cysteine rich domain, a spacer domain and two CUB domains (CUB1-2)<sup>1,2</sup>. The VWF/ADAMTS13 system is a highly specific enzyme-substrate complex and VWF is the only known substrate of ADAMTS13<sup>3</sup>. The flexibility of ADAMTS13 is the key to its proteolytic cleavage of VWF<sup>4</sup>. ADAMTS13 adopts physiologically a closed and inactive conformation sustained by interactions between the CUB1 and spacer domains<sup>5</sup>, which are dissociated when ADAMTS13 binds to the D4 domain of VWF thanks to the CUB1-2 domains, then leading to an open active conformation ADAMTS13<sup>6</sup>. The shear forces-induced unfolding of the A2 domain of VWF allows the spacer and cysteine rich domains of ADAMTS13 to bind to VWF and to adequately position the metalloprotease domain in order to cleave the scissile bond Y1605-M1606<sup>7-9</sup>. The binding of an exosite within the ADAMTS13 disintegrin domain to VWF triggers a conformational shift leading an active metalloprotease<sup>10</sup>. A severe functional deficiency in ADAMTS13 leads to the accumulation of ultralarge VWF multimers that spontaneously bind to platelets to form platelet rich microthrombi obstructing the microcirculation and resulting in thrombocytopenia and hemolytic anemia<sup>11-13</sup>. This specific form of thrombotic microangiopathy (TMA) is known as thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), a rare but life-threatening disease in the absence of emergency specific treatment relying in all cases on plasma exchange as a source of ADAMTS13<sup>14</sup>. TTP pathophysiology was elucidated in the late 1990s<sup>15</sup>. In the vast majority of cases, TTP is an acquired disease (aTTP) most often autoimmune caused by anti-ADAMTS13 antibodies (iTTP)<sup>16,17</sup>. In roughly 20% of cases, aTTP may not be associated with anti-ADAMTS13 autoantibodies and thus remain of unidentified pathophysiology (uTTP)<sup>18</sup>. Congenital TTP (cTTP) is on the contrary an even rarer form of this rare disease and stems from biallelic deleterious mutations of the *ADAMTS13* gene, cloned for the first time in 2001<sup>19</sup>. While TTP in its classic form is idiopathic, it can also be associated with various clinical contexts such as autoimmune diseases, infections, transplantations and the very challenging situation of pregnancy<sup>20-22</sup>. In the context of pregnancy, the clinical features of TTP may overlap with pregnancy specific and overall more frequent TMAs such as preeclampsia (PE) or HELLP syndrome<sup>23-27</sup>. Natural courses of VWF factor and ADAMTS13 levels in pregnancy<sup>28</sup> could also be a risk factor. A specificity of pregnancy onset TTP is the relatively high frequency of the otherwise extremely rare cTTP, which accounts for 24 to 66% of the published cohorts<sup>29-32</sup>. The distinction between cTTP and aTTP (either iTTP or uTTP) at the acute phase is practically impossible without genetic analysis, but is crucial to adapt management and subsequent follow-up<sup>33,34</sup>. This study is a retrospective multicentric study focusing on all pregnancy-onset TTP that were diagnosed and managed in France from 2000 to 2020 and includes epidemiology, clinical et genotypic data regarding diagnosis, management and follow-up. We also performed novel ADAMTS13 investigation assays on this cohort, namely chemiluminescent ADAMTS13 activity<sup>35</sup> and ADAMTS13 conformation<sup>36</sup>, in order to better characterize the pathophysiology of pregnancy-onset TTP. We finally assessed sFit-1/PIGF ratios in our cohort to evaluate its significance in obstetrical TTP. To our

knowledge, this is the first time this ratio validated for the diagnosis of PE has been performed on TTP patients.

## Patients and methods

### Patients

Since 2000, all patients with a presumptive diagnosis of TMA (defined as the presence of microangiopathic hemolytic anemia with hemoglobin level < 12 g/dL and/or thrombocytopenia < 150 x 10<sup>9</sup>/L with or without ischemic manifestations) have been prospectively enrolled in the registry of the French registry of the National Reference Center for TMA thanks to the Health Ministry National Plan for Rare Diseases. ADAMTS13 investigation is carried out in the central French reference laboratory. This study is a retrospective observational multicentric study focusing on patients presenting their first TTP bout (ADAMTS13 activity <10 IU/dL, associated or not with anti-ADAMTS13 IgG or bi-allelic deleterious *ADAMTS13* mutations) during either pregnancy, post-partum or in the aftermath of an abortion as well as their subsequent follow-up spanning 20 years (2000-2020). Our strategy for the differential diagnosis between cTTP and acquired TTP (iTTP and uTTP) is depicted in **Suppl. Figure 1**. Clinical and biological data at acute phase and during follow-up (with a specific focus on subsequent pregnancies) were gathered through hospital reports. Placental histology reports, when available, were also collected. Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki. This study was approved by the Ethics Committee of Hospital Pitié-Salpêtrière (Paris, France) and is registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) under the number NCT00426686 and at the Health Authority and the French Ministry of Health under the number P051064/PHRC AOM05012.



**Suppl. Figure 1. Flowchart for the identification of pregnancy onset iTTP, uTTP and cTTP**

*iTTP*: auto-immune acquired thrombotic thrombocytopenic purpura, *uTTP*: thrombotic thrombocytopenic purpura of undertermined pathophysiology, *cTTP*: congenital thrombotic thrombocytopenic purpura.

### Blood collections and laboratory assays

Venous blood was drawn at the acute phase of TTP bout before any treatment and during follow-up, and collected into both 1:10 final volume of 3.8% sodium citrate and serum tube without clot activator for phenotypic analysis and into EDTA for genetic analysis. DNA, plasma and serum samples were available thanks to the Biobank of the French National Reference Center for TMA (CRB-LRB, biobank BB-0033-00064 certified NFS 96-900, Lariboisière Hospital, APHP.Nord, Paris, France).

#### *ADAMTS13 assays*

Reference ADAMTS13 activity was measured in the context of care using our in-house FRETTS-VWF73 assay<sup>20</sup> adapted from Kokame et al<sup>37</sup> and retrospectively using the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay<sup>38</sup> (Instrumentation Laboratories, Bedford, MA, USA). Briefly, FRETTS-VWF73 is the current gold standard method for the measurement of ADAMTS13 activity. VWF73 peptide (Peptide Institute, Ibaraki, Japan) degradation products after cleavage by ADAMTS13 are detected and quantified using fluorescence. The HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity assay is performed on the ACL AcuStar® analyzer (Instrumentation Laboratories, Bedford, MA, USA). Plasma samples are incubated with magnetic particles coated with VWF73. An isoluminol-tagged monoclonal antibody then binds to the specifically cleaved VWF73 peptide by ADAMTS13. The detection and quantification of ADAMTS13 activity is performed through chemiluminescence. The normal range is 50-150 IU/dL with both assays.

Anti-ADAMTS13 IgG were detected and titered using the Technozym® ADAMTS13 INH ELISA assay (Technoclone, Vienna, Austria) with a positivity threshold at 15 U/mL according to the manufacturer's instructions.

ADAMTS13 antigen was measured using an in-house ELISA assay<sup>39</sup> based on a murine anti-ADAMTS13 antibody labelled 3H9 targeting an epitope located in the metalloprotease domain<sup>40</sup>. The normal range is 0.930-1.350 µg/mL<sup>41</sup>. A minimal antigen level of 0.03 µg/mL is required to determine ADAMTS13 conformation. ADAMTS13 conformation is assessed with an in-house ELISA assay<sup>36</sup> using a murine anti-ADAMTS13 antibody labelled 1C4. 1C4 antibody targets a cryptic epitope located within the spacer domain of ADAMTS13 which is only accessible for binding if ADAMTS13 conformation is open. The ability of 1C4 antibody to bind this cryptic epitope is measured with and without a murine anti-ADAMTS13 antibody (anti-CUB1) labelled 17G2, mimicking the binding of ADAMTS13 to the D4CK domain of VWF, thus opening ADAMTS13 *in vitro*<sup>42</sup>. A conformation index can then be determined, reflecting the increase of 1C4 binding induced by the opening of ADAMTS13 by 17G2. A conformation index  $\leq 0.5$  corresponds to a closed ADAMTS13 while a conformation index  $> 0.5$  corresponds to an open ADAMTS13<sup>36</sup>.

*ADAMTS13* (NM\_139025.4) genotype was determined using direct sequencing of the coding sequence with Big Dye version 3.1 ABI3130XL capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, United States) and analyzed with SeqScape version 2.5 (Applied Biosystems). The deleterious status of *ADAMTS13* mutations was determined using the databases for *ADAMTS13* variations (Clinvar).



### *sFlt-1 and PIGF*

sFlt-1 (Soluble fms-like tyrosine kinase-1) and PIGF (Placental Growth Factor) are respectively two anti- and pro-angiogenic molecules secreted mainly by the placenta which are imbalanced in patients with pre-eclampsia. The sFlt-1/PIGF ratio is a biomarker used for the screening of short-term prediction of pre-eclampsia<sup>43</sup>. sFlt-1 and PIGF levels were retrospectively quantified in serum drawn at the acute phase for each eligible patient (post-partum onset TTP, abortions, twin pregnancies and patients for whom only plasma was available were excluded) using the Roche Elecsys immunoassay on a Cobas e 601 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. sFlt-1/PIGF ratio was then determined for each patient and compared to gestational age-specific thresholds determined by the manufacturer: a ratio of 85 if the TTP bout occurred earlier than 34 weeks of amenorrhea and a ratio of 110 if the TTP bout occurred later are highly indicative of short-term preeclampsia.

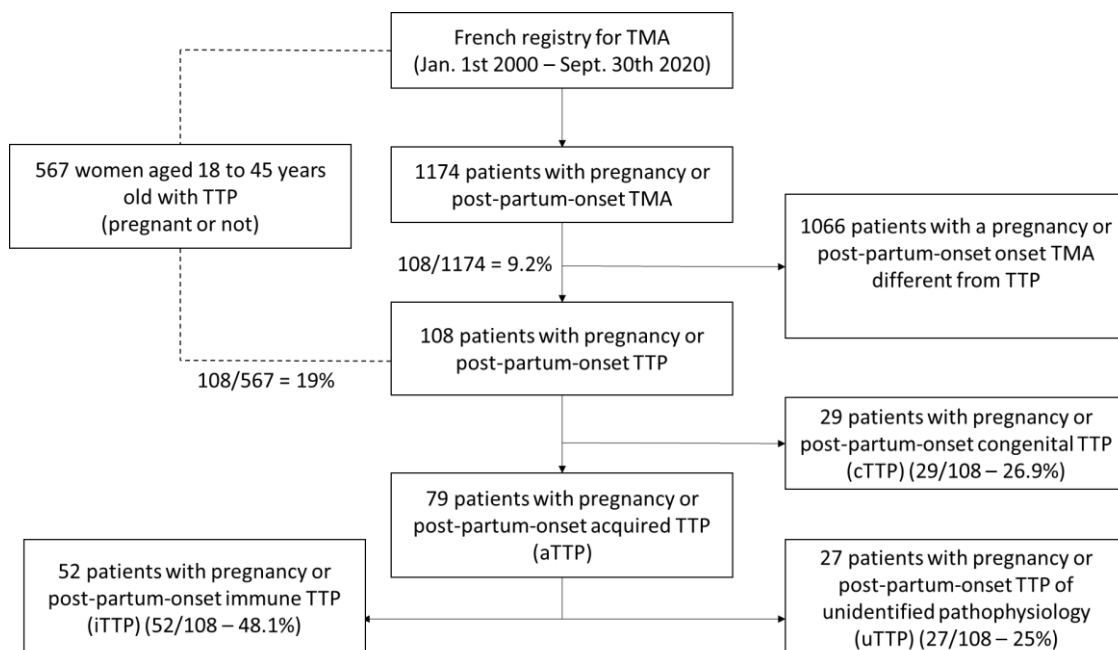
### *Statistics*

Quantitative parameters are reported as median, minimum-maximum and inter-quartile range (IQR) values and were compared with the nonparametric Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis test when appropriate. Qualitative parameters are reported as numbers and proportions, with 95% confidence intervals (95% CIs) for survival rates. Statistical significance was set at  $p < .05$ . Statistical analysis was performed using Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

## Results

### 1) Inaugural acute phase presentation and outcome

In the 20 years this study spans, 1174 patients with pregnancy-onset TMA were prospectively enrolled in our registry and were investigated for ADAMTS13, which allowed to diagnose 108 (9%) patients with pregnancy-onset TTP (**Fig. 1**). In the same timeframe, a total of 567 women (pregnant or not) aged 18 to 45 were diagnosed with TTP, indicating that obstetrical TTP represents 19% (108/567) of TTP in women of child-bearing age. Subsequent investigation, including anti-ADAMTS antibodies and *ADAMTS13* sequencing, led to the identification of 52 iTTP (52/108, 48.1%), 27 uTTP (27/108, 25%) and 29 cTTP (29/108, 26.9%). Sixty-four patients had their inaugural TTP boost during their first pregnancy (64/108, 59.3%) and the remaining 44 patients previously experienced at least one pregnancy, and up to seven. The main ethnic groups were Caucasian (69/108, 63.8%), Afro-Caribbean (21/108, 19.4%) and North-African (16/108, 14.8%). The vast majority of patients (72/108, 67%) had no other clinical context other than pregnancy. Noteworthy contexts were autoimmune diseases (18/108, 16.7%), infections (17/108, 15.7%), ovarian stimulation for in vitro fecundation (5/108, 4.6%) or abortion (2/108, 1.9%).



**Figure 1. Flowchart of the pregnancy-onset TTP patient enrollment in the cohort study.**

From 2000 to 2020, 1174 patients with pregnancy onset-TMA were enrolled and investigated for ADAMTS13. One hundred and eight patients had a severe functional deficiency in ADAMTS13 and were subsequently diagnosed with pregnancy-onset TTP. Out of those 108 patients, 52 had immune TTP (iTTP, with anti-ADAMTS13 IgG >15 U/mL), 27 had TTP of unidentified pathophysiology (uTTP, with anti-ADAMTS13 IgG <15 U/mL) and 29 had congenital TTP (cTTP).

The demographic, clinical and biologic features of our 108 patients are presented in **Table 1**. The median age reported was 28 years old, spanning from 17 to 44 years old (IQR 8 years), and was fairly similar within the three subgroups. Median term during which TTP bout occurred was 30 weeks of

amenorrhea (WA) (extreme values, 5 WA – 4 weeks post-partum, IQR 10 weeks). Seven patients (7/108, 6.5%) had twin pregnancies. The majority of patients experienced their TTP bout during the last third of their pregnancy: 53 patients during the third trimester and 17 during post-partum. Thirteen patients were diagnosed with TTP during their first trimester (including two patients who developed TTP in the aftermath of an abortion) and the 25 remaining patients experienced TTP during the second trimester of their pregnancy. These data were similar between the three subgroups. Maternal outcome was excellent in spite of five deaths (103/108, 95% survival rate, 95%CI: 90%-98%). Overall, after excluding two pregnancies that ended in voluntary abortions, 80 live births were reported out of 106 pregnancies (80/106, 75.5% survival rate, 95%CI: 67%-83%). Main clinical features reported include fever (28/108, 25.9%), neurologic symptoms (5°/108, 46.3%), high blood pressure (29/108, 26.8%), abdominal pain (42/108, 38.9%) and acute kidney failure (44/108, 40.7%). Of interest, high blood pressure and acute kidney failure were statistically more frequent in the uTTP group ( $p < 0.05$  for both). The median platelet count was 18 G/L (extreme values 4-140 G/L, IQR 20 G/L), and was significantly higher ( $p < 0.0001$ ) in the uTTP subgroup (median 34 G/L) than in the iTTP and cTTP subgroups (respectively median 13 G/L and 19 G/L). Similarly, while median serum creatinine was 94  $\mu\text{mol/L}$  (extreme values 24-500  $\mu\text{mol/L}$ , IQR 119  $\mu\text{mol/L}$ ) for the whole cohort, it was statistically higher ( $p < 0.005$ ) in the uTTP subgroup (median 202  $\mu\text{mol/L}$ ) than in the iTTP and cTTP subgroups (respectively median 84  $\mu\text{mol/L}$  and 79  $\mu\text{mol/L}$ ). The median hemoglobin level was 7.7 g/dL (extreme values 3-14.3 g/dL, IQR 2.1 g/dL) and median LDH level was 1400 U/L (extreme values 139-32000 U/L, IQR 1992 U/L), with no discrepancy between groups.

**Table 1. Demographic, clinical and biological characteristics of the pregnancy-onset inaugural TTP bout in 108 patients.**

| Demographic features                      | iTTP (n = 52)                    | uTTP (n = 27)                    | cTTP (n = 29)                  | Total (n = 108)                  |
|---|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Age (years)                               | 29 (17-44, 8)                    | 28 (18-44, 11)                   | 27 (21-42, 7)                  | 28 (17-44, 8)                    |
| Gestational age (weeks of amenorrhea)     | 30 (6-39+4 weeks postpartum, 11) | 34 (5-39+2 weeks postpartum, 11) | 30 (5-39+2 days postpartum, 8) | 30 (5-39+4 weeks postpartum, 10) |
| Gravidity                                 | 2 (1-6, 2)                       | 2 (1-7, 2)                       | 1 (1-5, 1)                     | 2 (1-7, 2)                       |
| Parity                                    | 1 (0-5, 2)                       | 1 (0-6, 1)                       | 1 (0-3, 1)                     | 1 (0-6, 2)                       |
| Twin pregnancies                          | 2/52 (3.8%)                      | 4/27 (14.8%)                     | 1/29 (3.5%)                    | 7/108 (6.5%)                     |
| Maternal survival                         | 48/52 (92.3%)                    | 26/27 (96.2%)                    | 29/29 (100%)                   | 103/108 (95%)                    |
| Fetal survival                            | 35/50* (70%)                     | 21/27 (77.8%)                    | 21/29 (72.4%)                  | 80/106 (75.5%)                   |
| <b>Clinical features</b>                  |                                  |                                  |                                |                                  |
| Fever                                     | 17/52 (32.7%)                    | 9/27 (33.3%)                     | 2/29 (6.8%)                    | 28/108 (25.9%)                   |
| Neurologic symptoms                       | 30/52 (57.7%)                    | 13/27 (48.2%)                    | 7/29 (24%)                     | 50/108 (46.3%)                   |
| High blood pressure                       | 7/52 (13.5%)                     | 14/27 (51.8%)                    | 8/29 (27.6%)                   | 29/108 (26.8%)                   |
| Abdominal pain                            | 19/52 (36.5%)                    | 12/27 (44.4%)                    | 11/29 (37.9%)                  | 42/108 (38.9%)                   |
| Acute kidney failure                      | 17/52 (32.7%)                    | 18/27 (66.7%)                    | 9/29 (31%)                     | 44/108 (40.7%)                   |
| <b>Biological features</b>                |                                  |                                  |                                |                                  |
| Platelet count ( $\times 10^9/\text{L}$ ) | 13 (4-78, 9)                     | 34 (8-140, 34)                   | 19 (8-65, 12)                  | 18 (4-140, 20)                   |
| Hemoglobin level (g/dL)                   | 7.2 (3-11, 2.1)                  | 8.1 (5.3-14.3, 1.8)              | 7.9 (3.4-11.9, 2.2)            | 7.7 (3-14.3, 2.1)                |
| Serum Creatinine ( $\mu\text{mol/L}$ )    | 80 (37-300, 87)                  | 202 (24-500, 300)                | 79 (48-125, 48)                | 94 (24-500)                      |
| LDH (U/L)                                 | 1588 (161-8000, 1460)            | 1400 (139-32000, 2400)           | 1000 (241-7000, 2325)          | 1400 (139-32000, 1992)           |

Categorical variables are presented as n/number of patients and percentage. Continuous variables are presented as median (extreme values, IQR). LDH : lactate deshydrogenase. iTTP : immune thrombotic thrombocytopenic purpura. uTTP : thrombotic thrombocytopenic purpura of unidentified pathophysiology. cTTP : congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. \* Two pregnancies were ended (abortion).

Fetal outcome as a function of gestational age at acute phase of TTP is presented in **Table 2**. Fetal outcome appears to be highly dependent on the pregnancy term: 19 fetal deaths (18 intra-uterine fetal death and 1 medical termination of pregnancy) were reported out of the 25 second trimester pregnancies (6/25, 24% survival rate, 95%CI: 11.5%-43.4%), six fetal deaths were reported out of the 11 first trimester pregnancies (5/11, 45.5% survival rate, 95%CI: 21.3%-72%) who experienced TTP during their first trimester, five fetal deaths were reported out of the 53 patients (48/53, 90.6% survival rate, 95%CI: 79.7%-95.9%) and no fetal death was reported out of the 17 post-partum TTP.

**Table 2. Fetal outcome as a function of gestational age at the inaugural acute phase of TTP in 108 patients.**

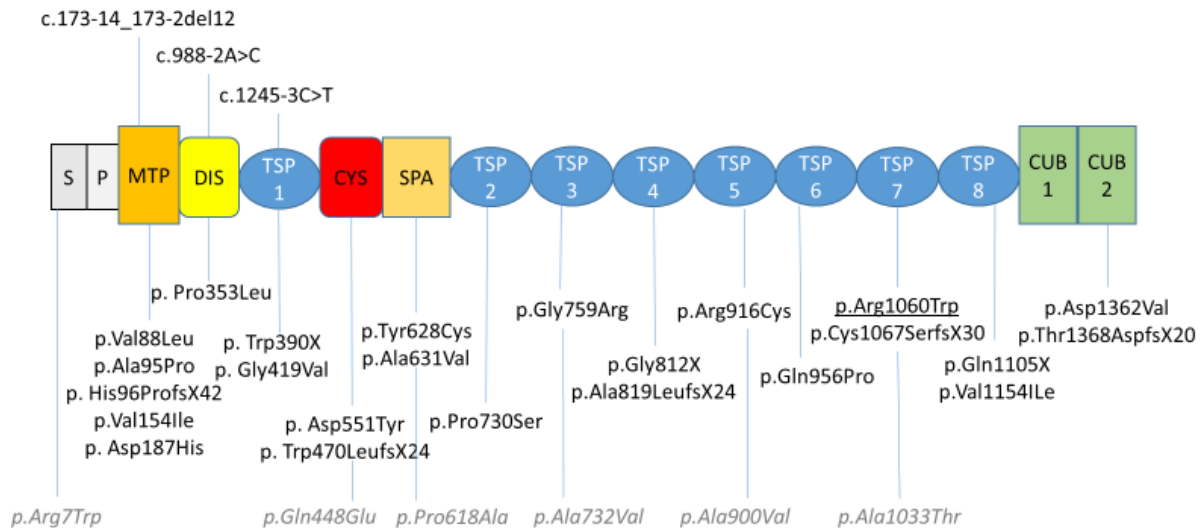
|                  | iTTP (n = 50)* | uTTP (n = 27) | cTTP (n = 29) | Total (n = 106) |
|------------------|----------------|---------------|---------------|-----------------|
| First trimester  | 4/8 (50%)      | 1/1 (100%)    | 1/2 (50%)     | 6/11 (54.5%)    |
| Second trimester | 3/11 (27.2%)   | 0/5 (0%)      | 3/9 (33.3%)   | 6/25 (24%)      |
| Third trimester  | 19/22 (86.4%)  | 15/16 (93.8%) | 14/15 (93.3%) | 48/53 (90.6%)   |
| Postpartum       | 9/9 (100%)     | 5/5 (100%)    | 3/3 (100%)    | 17/17 (100%)    |

*The results are presented as number of live birth/number of pregnancies (survival rate). First trimester refers to pregnancies complicated by a TTP bout before 15 weeks of amenorrhea; second trimester refers to pregnancies complicated by a TTP bout between 16 and 28 weeks of amenorrhea; third trimester refers to pregnancies complicated by a TTP bout after 28 weeks of amenorrhea but before birth; postpartum refers to pregnancies complicated by a TTP bout within the weeks after birth. iTTP : immune thrombotic thrombocytopenic purpura. uTTP : thrombotic thrombocytopenic purpura of unidentified pathophysiology. cTTP : congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. \* Two pregnancies were ended (abortion) and are therefore not reported in this table.*

Nine (9/108, 8.3%) placental pathology reports were available: 2 iTTP, 2 aTTP and 5 cTTP. The reports were fairly consistent and described severe placental ischemia with numerous intervillous thrombi of various ages.

## 2) Genotypic analysis of cTTP patients

The genotypes of the 29 cTTP patients are presented in the supplementary **Table 1**. Most of these cTTP patients were previously reported by our group<sup>20,31,44</sup>. A total of 27 deleterious sequence variations are reported: 15 missense mutations, 5 frameshift mutations, 3 nonsense mutations, 2 splicing mutations and 2 deletions. The missense mutation p.Arg1060Trp (R1060W) is overwhelmingly frequent, being found in 21 out of 29 patients (21/29, 72.4%), 6 of which were homozygous. Overall, 19 patients were compound heterozygous, including one with 3 mutations. Three patients only had one mutation and one patient was hemizygous for the *ADAMTS13* gene, with no mutation on her remaining allele but 4 polymorphisms. Five SNPs in the *ADAMTS13* gene were found quite frequently in our cohort: p.Arg7Trp, p.Gln448Glu, p.Pro618Ala, p.Ala732Val and p.Ala900Val. An illustration of the *ADAMTS13* mutations found in our cohort of cTTP patients is presented in **Fig. 2**. The mutations found span the entire gene with no obvious hotspot except the predominant R1060W mutation.



**Figure 2. ADAMTS13 sequence variations reported in the 29 pregnancy-onset cTTP.**

*Deleterious sequence variations appear in black while SNPs appear in grey. S : signal peptide, P : propeptide, MTP : metalloprotease domain, DIS : disintegrin domain, TSP-1 : thrombospondin type-1 repeats, CYS : cysteine rich domain, SPA : spacer domain, CUB : Complement protein subcomponents C1r/C1s, Urchin embryonic growth factor and Bone morphogenetic protein 1 domain*

**Supp. Table 1. Genetic analysis of *ADAMTS13* in 29 patients with pregnancy-onset cTTP**

| Patient | <i>ADAMTS13</i> mutations    |                                    |  |   |                    | <i>ADAMTS13</i> polymorphisms  |
|---------|------------------------------|------------------------------------|--|---|--------------------|--|
|         | Intron/exon                  | Variant                            | Status                                       | Protein                                   | Domain             |  |
| 1*      | Exon 20<br>Exon 24           | c.2434G>T<br>c.3178C>T             | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Glu812X<br>p.Arg1060Trp                 | TSP4<br>TSP7       | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)   |
| 2*      | Exon 20<br>Exon 24           | c.2434G>T<br>c.3178C>T             | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Glu812X<br>p.Arg1060Trp                 | TSP4<br>TSP7       | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)   |
| 3       | Exon 24<br>Exon 29           | c.3178C>T<br>c.4085A>T             | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Arg1060Trp<br>p.Asp1362Val              | TSP7<br>CUB2       | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)  |
| 4       | Exon 24                      | c.3178C>T                          | Heterozygous                                 | p.Arg1060Trp                              | TSP7               | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.1852C>G (p.Pro618Ala)<br>c.2195C>T (p.Ala732Val)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)                         |
| 5       | Exon 24                      | c.3178C>T                          | Homozygous                                   | p.Arg1060Trp                              | TSP7               | c.19C>T (p.Arg7Trp) <sup>#</sup><br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr) <sup>#</sup>  |
| 6       | Exon 9<br>Exon 24            | c.1058C>T<br>c.3178C>T             | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Pro353Leu<br>p.Arg1060Trp               | DIS<br>TSP7        | c.19C>T (p.Arg7Trp) <sup>#</sup><br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.1852C>G (p.Pro618Ala)<br>c.2195C>T (p.Ala732Val)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)            |
| 7       | Exon 6<br>Intron 8           | c.559G>C<br>c.988-2A>C             | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Asp187His<br>-                          | MTP<br>DIS         | NONE   |
| 8       | Exon 23<br>Exon 24           | c.2867A>C<br>c.3178C>T             | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Gln956Pro<br>p.Arg1060Trp               | TSP6<br>TSP7       | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.2699C>T (p.Ala900Val)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)   |
| 9       | Exon 3<br>Exon 16<br>Exon 24 | c.283G>C<br>c.1892C>T<br>c.3178C>T | Heterozygous<br>Heterozygous<br>Heterozygous | p.Ala95Pro<br>p.Ala631Val<br>p.Arg1060Trp | MTP<br>SPA<br>TSP7 | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)  |
| 10      | Exon 3<br>Exon 24            | c.262G>C<br>c.3178C>T              | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Val88Leu<br>p.Arg1060Trp                | MTP<br>TSP7        | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.1852C>G (p.Pro618Ala)<br>c.2699C>T (p.Ala900Val)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)                         |
| 11      | Intron 8<br>Exon 18          | c.988-2A>C<br>c.2188C>T            | Heterozygous<br>Heterozygous                 | -<br>p.Pro730Ser                          | DIS<br>TSP2        | NONE   |
| 12      | Exon 5<br>Exon 24            | c.460G>A<br>c.3178C>T              | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Val154Ile<br>p.Arg1060Trp               | MTP<br>TSP7        | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)  |
| 13      | Exon 16                      | c.1883A>G                          | Heterozygous                                 | p.Tyr628Cys                               | SPA                | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.1852C>G (p.Pro618Ala)<br>c.2195C>T (p.Ala732Val)   |
| 14°     | NONE                         | -                                  | Hemizygous                                   | -   | -                  | c.19C>T (p.Arg7Trp) <sup>#</sup><br>c.1342C>G (p.Gln448Glu) <sup>#</sup><br>c.1852C>G (p.Pro618Ala) <sup>#</sup><br>c.2195C>T (p.Ala732Val) <sup>#</sup> |
| 15      | Exon 14<br>Exon 24           | c.1651G>T<br>c.3178C>T             | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Asp551Tyr<br>p.Arg1060Trp               | CYS<br>TSP7        | c.19C>T (p.Arg7Trp) <sup>#</sup><br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.1852C>G (p.Pro618Ala)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)                                       |
| 16      | Exon 24                      | c.3178C>T                          | Homozygous                                   | p.Arg1060Trp                              | TSP7               | c.19C>T (p.Arg7Trp) <sup>#</sup><br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr) <sup>#</sup>  |
| 17      | Exon 24                      | c.3178C>T                          | Homozygous                                   | p.Arg1060Trp                              | TSP7               | c.19C>T (p.Arg7Trp) <sup>#</sup><br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr) <sup>#</sup>  |
| 18      | Exon 3<br>Exon 11            | c.287_288del<br>c.1256G>T          | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.His96ProfsX42<br>p.Gly419Val            | MTP<br>TSP1        | NONE   |
| 19      | Exon 19<br>Exon 29           | c.2275G>A<br>c.4101dupG            | Heterozygous<br>Heterozygous                 | p.Gly759Arg<br>p.Thr1368AspfsX20          | TSP3<br>CUB2       | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)   |

|     |                      |                                       |                              |                                  |              |  |
|-----|----------------------|---------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------|--|
| 20  | Exon 24              | c.3178C>T                             | Homozygous                   | p.Arg1060Trp                     | TSP7         | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)  |
| 21  | Exon 24              | c.3178C>T                             | Homozygous                   | p.Arg1060Trp                     | TSP7         | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)  |
| 22  | Exon 24<br>Exon 25   | c.3178C>T<br>c.3313C>T                | Heterozygous<br>Heterozygous | p.Arg1060Trp<br>p.Gln1105X       | TSP7<br>TSP8 | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)   |
| 23  | Intron 2<br>Exon 24  | c.173-14_173-2del12<br>c.3198_3199del | Heterozygous<br>Heterozygous | -<br>p.Cys1067SerfsX30           | MTP<br>TSP7  | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.1852C>G (p.Pro618Ala)<br>c.2195C>T (p.Ala732Val)                             |
| 24  | Exon 22<br>Exon 24   | c.2746C>T<br>c.3178C>T                | Heterozygous<br>Heterozygous | p.Arg916Cys<br>p.Arg1060Trp      | TSP5<br>TSP7 | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)  |
| 25  | Exon 24              | c.3178C>T                             | Homozygous                   | p.Arg1060Trp                     | TSP7         | c.19C>T (p.Arg7Trp) <sup>#</sup><br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr) <sup>#</sup>  |
| 26° | Exon 20<br>Exon 24   | c.2455delG<br>c.3178C>T               | Heterozygous<br>Heterozygous | p.Ala819LeufsX24<br>p.Arg1060Trp | TSP4<br>TSP7 | NONE   |
| 27  | Exon 10<br>Intron 10 | c.1169G>A<br>c.1245-3C>T              | Heterozygous<br>Heterozygous | p.Trp390X<br>-                   | TSP1<br>TSP1 | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.2699C>T (p.Ala900Val)   |
| 28  | Exon 12<br>Exon 24   | c.1408dup<br>c.3178C>T                | Heterozygous<br>Heterozygous | p.Trp470LeufsX64<br>p.Arg1060Trp | CYS<br>TSP7  | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr)  |
| 29  | Exon 24              | c.3178C>T                             | Heterozygous                 | p.Arg1060Trp                     | TSP7         | c.19C>T (p.Arg7Trp)<br>c.1342C>G (p.Gln448Glu)<br>c.1852C>G (p.Pro618Ala)<br>c.2195C>T (p.Ala732Val)<br>c.3097G>A (p.Ala1033Thr) |

\* Patients 1 and 2 are sisters.

# Homozygous

° Genetic sequence checks were performed, explaining the discrepancy with our previous publications



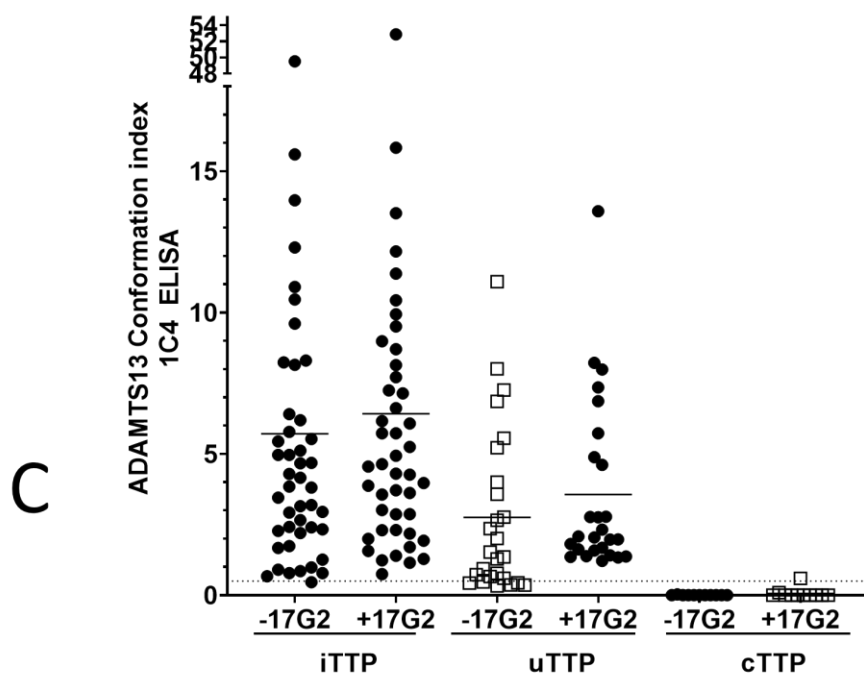
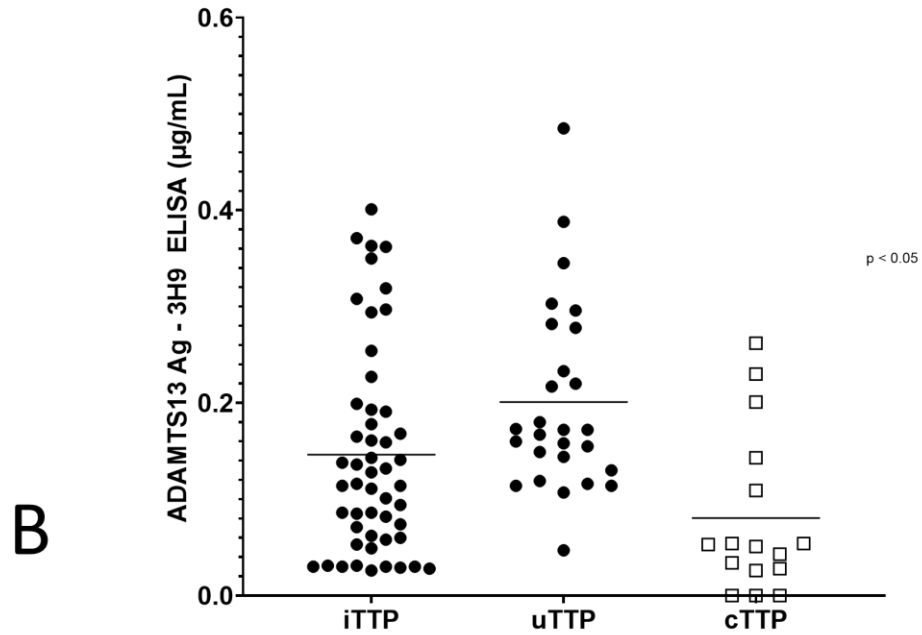
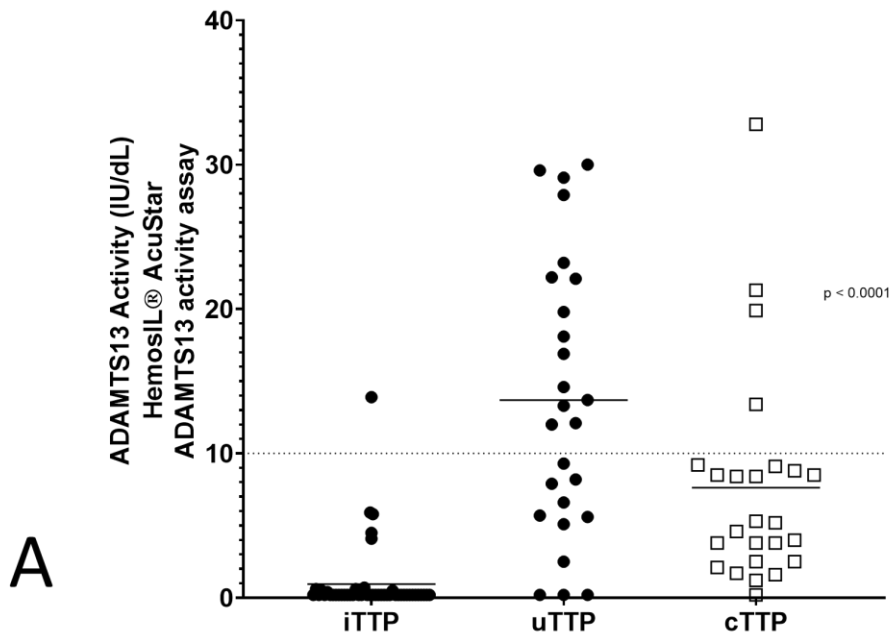
### 3) TTP acute phase exploration using new tools

Data representing ADAMTS13 activity, antigen and conformation are presented in **Fig. 3**. ADAMTS13 activity was retrospectively assessed with both the FRETTS-VWF73 assay (as a control of the result found in real-life practice) and the HemosIL® AcuStar chemiluminescent assay on the same sample. All 108 patients exhibited an ADAMTS13 activity < 10 IU/dL with the FRETTS-VWF73 (according to the initial real-life measurement) but, surprisingly, 20 patients (20/108, 18.5%) showed discrepant ADAMTS13 activity ranging from 12 to 33 IU/dL with the HemosIL® AcuStar assay (**Fig. 3A**). Among these 20 discrepant patients, 1 had iTTP, 15 had uTTP and 4 had cTTP. Overall, iTTP patients had a significantly lower median ADAMTS13 activity (median <0.2 IU/dL, extreme values <0.2-13.9 IU/dL, IQR 0 IU/dL) compared to uTTP (median 12.7 IU/dL, extreme values <0.2 – 30 IU/dL, IQR 16.4 IU/dL) and cTTP (median 5.2 IU/dL, extreme values <0.2-32.6 IU/dL, IQR 6.5 IU/dL) ( $p < 0.0001$ ).

ADAMTS13 antigen was decreased (lower than the normal range) in all 108 patients. Median ADAMTS13 antigen in the iTTP group was 0.116 µg/mL (extreme values 0.026-0.401 µg/mL, IQR 0.133 µg/mL) and median ADAMTS13 antigen was 0.172 µg/mL in the uTTP group (extreme values 0.047-0.485 µg/mL, IQR 0.148 µg/mL). Interestingly, ADAMTS13 antigen was significantly lower in the iTTP group than in the uTTP group ( $p < 0.05$ ). ADAMTS13 antigen in the cTTP group were detectable although very low (median 0.052 µg/mL, extreme values <0.02-0,262 µg/mL, IQR 0,108 µg/mL) as previously published by our group <sup>44</sup>. (**Fig. 3B**).

Because a minimal ADAMTS13 antigen level of 0.03 µg/mL is necessary to determine ADAMTS13 conformation, 7 patients had to be excluded. ADAMTS13 conformation is adult-onset cTTP was previously reported by our group to be folded in all tested patients. However, the addition of 17G2 antibody did not open as expected ADAMTS13 in 9 tested patients, suggesting that ADAMTS13 gene sequence variations connected to cTTP could interfere with the conformational activity induced by 17G2 antibody <sup>44</sup>.

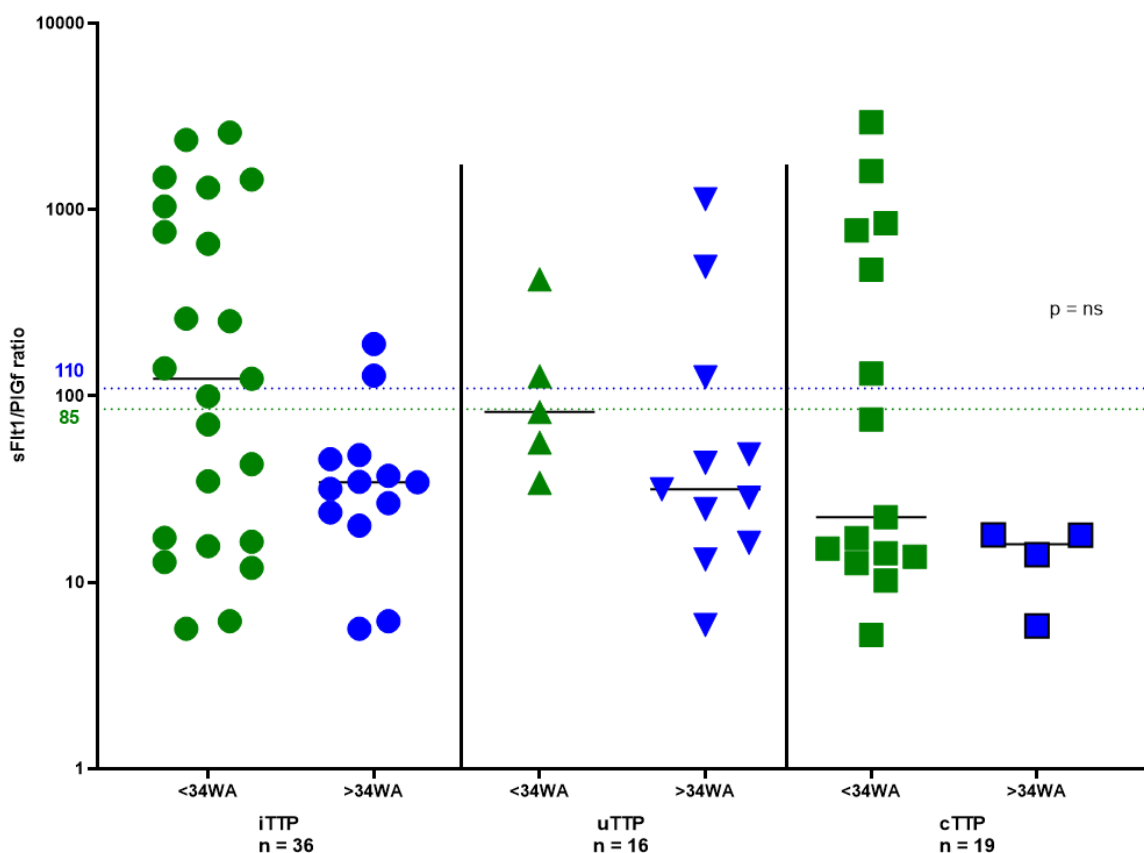
ADAMTS13 conformation before and after addition of the opening 17G2 antibody in 101 patients are presented in **Fig. 3C**. ADAMTS13 conformation was open in almost all iTTP patients (45/46, 97.8%), only one iTTP patient with a borderline conformation index (CI) at 0.46. Surprisingly, ADAMTS13 conformation was also open in most patients with uTTP (20/26, 76.9%) although 6 uTTP exhibited a closed conformation of ADAMTS13 (**Fig. 3C**). Interestingly, all 6 uTTP with a closed ADAMTS13 conformation exhibited discrepant ADAMTS13 activity with the FRETTS-VWF73 assay (ADAMTS13 activity < 10 IU/dL) and the HemosIL® AcuStar assay (ADAMTS13 activity between 12 and 30 IU/dL).



**A. ADAMTS13 activity assessed by the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay, B. ADAMTS13 Antigen (3H9 ELISA) and C. ADAMTS13 conformation (1C4 ELISA) as a function of pregnancy-onset TTP subtype.**

A. ADAMTS13 activity of all pregnancy-onset TTP patients of our cohort was retrospectively measured using the HemosIL® AcuStar ADAMTS13 activity assay, a chemiluminescent assay. In the iTTP subgroup, median ADAMTS13 activity was found <0.2 IU/dL (range <0.2-13.9 IU/dL), while median ADAMTS13 activity was slightly higher at 5.2 IU/dL in the cTTP subgroup (range <0.2-32.6 IU/dL) and even higher in the uTTP subgroup with a median ADAMTS13 activity at 12.7 IU/dL (range <0.2-30.0 IU/dL) ( $p < 0.0001$ ). B. ADAMTS13 antigen was decreased (lower than the normal range) in all 108 patients. Median ADAMTS13 antigen in the iTTP group was 0.116  $\mu\text{g/mL}$  (extreme values 0.026-0.401  $\mu\text{g/mL}$ , IQR 0.133  $\mu\text{g/mL}$ ), median ADAMTS13 antigen was 0.172  $\mu\text{g/mL}$  in the uTTP group (extreme values 0.047-0.485  $\mu\text{g/mL}$ , IQR 0.148  $\mu\text{g/mL}$ ) and median ADAMTS13 antigen was 0.054  $\mu\text{g/mL}$  in the cTTP group (extreme values <0.02-0,262 $\mu\text{g/mL}$ , IQR 0,108  $\mu\text{g/mL}$ ) as previously reported by Joly et al. C. ADAMTS13 conformation was performed using the homemade 1C4 ELISA assay on all iTTP and uTTP patients whose ADAMTS3 antigen level determined with the homemade 3H9 ELISA assay are above 0.03  $\mu\text{g/mL}$  and had sufficient plasma volume to perform the assays (46/52 iTTP, 26/27 uTTP and 11/29 cTTP). ADAMTS13 conformation was found open in all but one iTTP patients tested (45/46, 97.8%) and open in the majority of uTTP patients tested (20/26, 76.9%). As previously reported by Joly et al., ADAMTS13 conformation was closed in all but one cTTP patients.

sFlt-1/PIGF ratios as a function of TTP subgroups and of pregnancy-term are presented in **Fig. 4**. sFlt-1/PIGF ratios were determined for a total of 71 patients (36 iTTP, 16 uTTP and 19 cTTP), the majority of which were <34 WA onset-TTP (43/71, 60.5%). Of particular interest, a sizeable portion of patients had sFlt-1/PIGF higher than the term-specific threshold of 85 within the <34 WA-onset TTP subgroup: 13/23 iTTP, 2/5 uTTP and 6/15 cTTP which amounts to 21/43 patients (48.8%). On the contrary, only a minority of patients had a higher than the term-specific threshold of 110 in the >34WA-onset TTP: 2/13 iTTP, 3/11 uTTP and none out of the 4 cTTP patients, the total amounting to 5/28 (17.8%). Of these 26 patients with elevated sFlt-1/PIGF ratio (15 iTTP, 5 uTTP and 6 cTTP), 25 (25/26, 96.2%) mothers and 19 (19/26, 73.1%) children survived: the seven reported fetal death all occurred in one first trimester-pregnancy (7 WA) and in six second trimester-pregnancies. While individual values vary greatly within each group, no significant discrepancy appears in between subgroups of similar pregnancy-term.



**Figure. 4** sFlt-1/PIGF ratio as a function of pregnancy-onset TTP subgroup.

sFlt-1/PIGF ratios were determined in all eligible patients (exclusion criteria were post-partum onset-TTP, abortions, twin pregnancies and patients for whom no serum was available) using the Roche Elecsys immunoassay on a Cobas e 601. A total of 71 samples were tested (36 iTTP, 16 uTTP and 19 cTTP), with the pregnancy-term specific thresholds of 85 if the TTP occurred before 34 WA and of 110 if the TTP bout occurred later. Within the <34 WA-onset TTP subgroup, 21/43 patients (48.8%) are reported to have a sFlt-1/PIGF ratio higher than the term-specific threshold of 85 (13/23 iTTP, 2/5 uTTP and 6/15 cTTP). In the >34 WA-onset TTP subgroup, only 5/29 patients (17.2%) had a higher than the term-specific threshold of 110 sFlt-1/PIGF (2/13 iTTP, 3/11 uTTP and none out of the 4 cTTP patients). There was no significantly statistical difference in between subgroups of similar pregnancy-term.

#### 4) Management

Therapeutic management of our patients is presented in **Table 3**.

A broad majority of patients (97/108, 89.8%) received curative plasmotherapy, either as plasma exchange or as fresh frozen plasma infusions. Only 11 patients received neither: one in the iTTP group (who died before plasmotherapy could be initiated), 8 in the uTTP group and 2 in the cTTP group. Corticosteroids were also widely used (76/108, 70.4%). Rituximab was chosen as an immunosuppressive therapy for 33 patients (33/108, 30.6%), mostly in the iTTP group (29/52, 55.8%), the four remaining patients being 1 uTTP and 3 cTTP (before the diagnosis of cTTP). Out of 29 iTTP who received rituximab, the treatment was implemented after either birth or fetal extraction in 22 patients and before fetal extraction in 7 patients. In the latter 7 patients, 5 pregnancies ended in fetal loss (one abortion, one medically terminated pregnancy, three IUFD) and 2 pregnancies (rituximab at 15 WA and 20 WA) ended well for the mother and the newborn, with no specific side effects reported for both newborns. The only uTTP and 2/3 cTTP received rituximab after fetal extraction while 1/3 cTTP received rituximab at 24WA, with a good maternal and fetal outcome as well.

As of 2022, there are no recommendation for the use of caplacizumab during pregnancy. Only four patients of our cohort (4/108, 3.7%), all iTTP, received caplacizumab, after birth or fetal extraction for all of them (**Table 3**). Those 4 patients happen to be the most recent included in our cohort. Other therapies used in association with plasmotherapy and corticosteroids were platelet concentrates (15/108, 13.9%), anti-hypertensive drugs (12/108, 11.1%), cyclophosphamide (1/108, 0.9%), heparin (4/108, 3.7%), aspirin (7/108 3.7%), and splenectomy (1/108, 0.9%) (**Table 3**).

**Table 3. Therapeutic management of patients with pregnancy-onset TTP.**

|   | iTTP (n = 52) | uTTP (n = 27) | cTTP (n = 29) | Total (n = 108) |
|---|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| Plasma exchange                                     | 50/52 (96.2%) | 19/27 (70.3%) | 16/29 (55.2%) | 85/108 (78.7%)  |
| Fresh frozen plasma infusions (no plasma exchanges) | 1/52 (1.9%)   | 0/27 (0%)     | 11/29 (37.9%) | 12/108 (11.1%)  |
| Corticosteroids                                     | 42/52 (80.8%) | 19/27 (70.3%) | 15/29 (51.7%) | 76/108 (70.4%)  |
| Rituximab   | 29/52 (55.8%) | 1/27 (3.7%)   | 3/29 (10.3%)  | 33/108 (30.6%)  |
| Caplacizumab  | 4/52 (7.7%)   | 0/27 (0%)     | 0/29 (0%)     | 4/108 (3.7%)    |
| Platelet concentrates                               | 9/52 (17.3%)  | 3/27 (11.1%)  | 3/29 (10.3%)  | 15/108 (13.9%)  |
| Antihypertensive drugs                              | 1/52 (1.9%)   | 5/27 (18.5%)  | 6/29 (20.6%)  | 12/108 (11.1%)  |
| Splenectomy   | 1/52 (1.9%)   | 0/27 (0%)     | 0/29 (0%)     | 1/108 (0.9%)    |
| Cyclophosphamide                                    | 1/52 (1.9%)   | 0/27 (0%)     | 0/29 (0%)     | 1/108 (0.9%)    |
| IV Immunoglobulins                                  | 3/52 (5.8%)   | 0/27 (0%)     | 0/29 (0%)     | 3/108 (2.8%)    |
| Heparin   | 3/52 (5.8%)   | 1/27 (3.7%)   | 0/29 (0%)     | 4/108 (3.7%)    |
| Aspirin   | 6/52 (11.5%)  | 1/27 (3.7%)   | 0/29 (0%)     | 7/108 (6.5%)    |

The results are presented as number of patients who received the therapeutic options/number of patients (percentage).

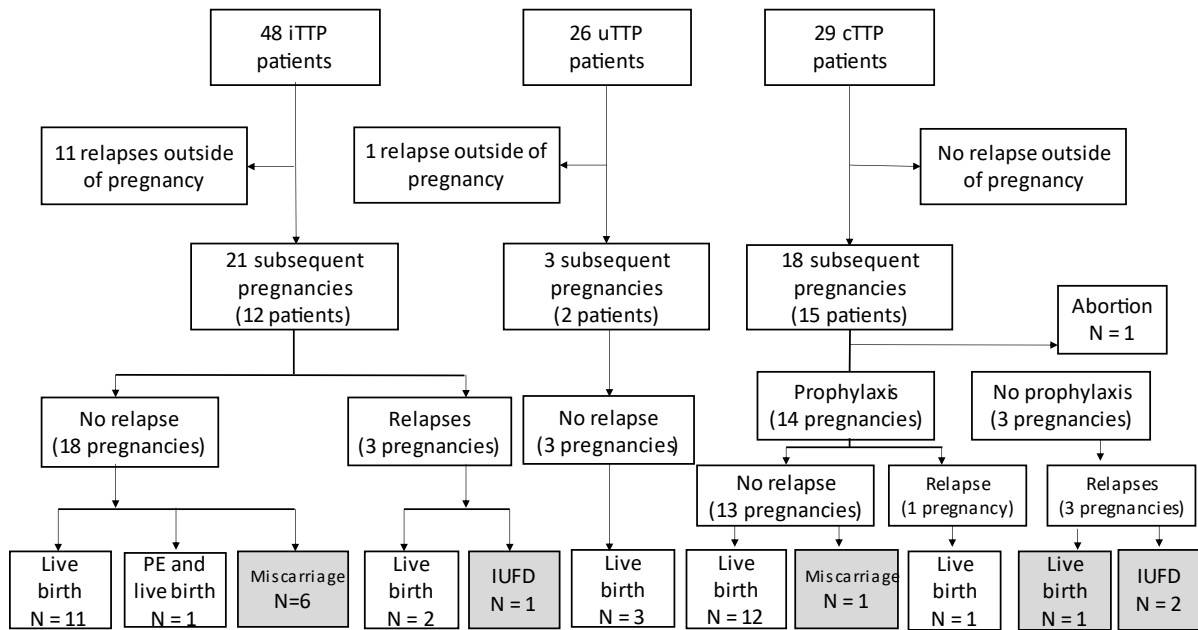
## 5) Follow-up

The median length of follow-up for iTTP and uTTP was 2 years (extreme values 0-18 years, IQR 7 years). Follow-up data are presented in **Fig. 5**. A TTP relapse, outside of pregnancy, was reported in 11 out of the 48 surviving iTTP patients (11/48, 22.9%), and in only one out of the 26 surviving uTTP patients (1/26, 3.8%). A total of 24 subsequent pregnancies were recorded (14 women: 12 with iTTP and 2 with uTTP). The 2 uTTP patients totalize 3 subsequent pregnancies, during which ADAMTS13 activity remained normal and no relapse occurred.

The 12 iTTP patients totalize 21 subsequent pregnancies, 11 of which ended with a live birth and no relapse. Eight patients were monitored on their ADAMTS13 activity, which were all normal. Of particular interest, 2 patients received aspirin and low molecular weight heparin during their pregnancy, and 3 patients received immunosuppressive therapy: two before their pregnancy (1 received rituximab as a pre-emptive therapy following a relapse that occurred 5 months before her pregnancy, and 1 received azathioprine, hydroxychloroquine and corticosteroid throughout her pregnancy because of a pre-existing lupus), and one received corticosteroids in post-partum (also because of a pre-existing lupus). Six pregnancies (2 patients, one of which also had lupus) ended in miscarriage: in four cases, ADAMTS13 activity had been measured and was normal. One pregnancy ended in pre-eclampsia, and a live birth, but no TTP relapse (although ADAMTS13 activity measured was found very low at 16 IU/dL). The final three pregnancies were unfortunately marked by a TTP relapse, ending with 2 live birth and 1 IUFD. In all three cases, ADAMTS13 activity measured at the beginning of the pregnancy was very low (either undetectable or at 20 IU/dL).

Median length of follow-up was 6.5 years (extreme values 0-16, IQR 6.5 years) in the cTTP group. No TTP relapse outside of pregnancy were reported for the 29 cTTP patients of our cohort. Eighteen pregnancies (15 women) were reported, closely managed. One pregnancy ended in abortion, three pregnancies were led without prophylaxis and subsequently were complicated by a TTP relapse, ending in 2 IUFD and 1 live birth. All 14 other pregnancies were carried out with prophylactic plasmatherapy. One pregnancy out of the remaining 14 resulted in miscarriage, but no relapse. Twelve pregnancies ended in a live birth with no relapse. The final pregnancy was marked by a TTP relapse with a live birth.





**Figure 5. Flowchart of the subsequent relapses and subsequent pregnancies as a function of pregnancy-onset TTP subgroup.**

iTTP : immune thrombotic thrombocytopenic purpura, uTTP : thrombotic thrombocytopenic purpura of unidentified mechanism, cTTP : congenital thrombotic thrombocytopenic purpura, PE : pre-eclampsia, IUFD : intra uterine fetal death.

A total of 12 relapses outside of pregnancies and 42 subsequent pregnancies were reported. Eleven relapses outside of pregnancies were observed in the 48 surviving iTTP patients, one in the surviving 26 uTTP group and none in the surviving 29 cTTP group. The 21 subsequent pregnancies reported in the iTTP group can be broken down into a no TTP relapse group (18 pregnancies : 11 live births, 6 miscarriages, 1 live birth complicated by pre-eclampsia) and a TTP relapse group (3 pregnancies : 2 live births and 1 IUFD). All three of the subsequent pregnancies reported in the uTTP group ended in live births without relapses. Finally, 18 pregnancies were monitored in the cTTP group. One ended in an abortion, 14 were led with prophylactic plasmatherapy preventing a relapse in 13 pregnancies (12 live births and 1 miscarriage). Despite prophylactic plasmatherapy, 1 TTP relapse was reported, ending with a live birth. The final three were carried out without prophylactic plasmatherapy and were all marked by a TTP relapse, with 2 IUFD and one live birth.

## Discussion

This study reports the world-wide largest cohort of pregnancy-onset TTP, and includes informative data about diagnostic features, management, outcome as well as follow-up spanning up to 18 years.

The 19% frequency of pregnancy-onset TTP within the overall women in child-bearing age group of TTP patients is fairly consistent with what is known and highlights the importance of pregnancy as a major TTP trigger<sup>45</sup>. The relatively high frequency of cTTP in this pregnancy-onset TTP cohort (27%) is also consistent with previous studies<sup>31,32,46</sup>. While the majority (65%) of the patients of our cohort experienced their TTP bout in the last third of their pregnancy (third trimester or post-partum), a sizeable portion (35%) of patients were diagnosed during the first or second trimester. This suggests that although rare, TTP should always be considered when dealing with pregnancy-onset TMA regardless of the pregnancy-term. Maternal outcome proved excellent and indicates that the past two decades have seen substantial improvement in the diagnosis and management of this overall very rare disease. Another confirmation of this study is the close relationship between fetal outcome and pregnancy-term. While it appears rational that fetal outcome is excellent in third trimester or post-partum pregnancy-onset TTP, the discrepancy between what we observe in first trimester and second trimester onset TTP is more surprising. Our data suggest a lower fetal survival rate in the second trimester pregnancy-onset TTP group, although the small number of patients requires caution in interpreting these data. A possible explanation, supported by placental pathology reports gathered in this study or in others<sup>24,32</sup>, is the severe placental ischemia with numerous intervillous thrombi caused by TTP. Another evidence gathered through our study is the unexpected number of patients with elevated sFlt-1/PIGF ratio regardless of the subtype of TTP (iTTP, uTTP, cTTP). While this ratio is usually performed in order to detect PE<sup>47,48</sup>, the placental hypoperfusion resulting because of TTP could lead to trophoblast dysfunction and altered endothelium and mimic PE. Out of the 19/25 fetal losses for second trimester pregnancy-onset TTP reported in this study, 6 (6/19, 31.9%) were associated with elevated sFlt1/PIGF ratio and this marker, never used before in the context of TTP as far as we know, deserves more studies to fully evaluate its usefulness in this context. Another novel and key point derived by our study is that while an elevated sFlt-1/PIGF ratio is an established diagnostic tool for PE, it does not rule out the much rarer TTP.

The different aspects of this study (genotypic analysis, ADAMTS13 conformation, clinical history, management and follow-up) allow us to distinguish three different subtypes of pregnancy-onset TTP with different mechanisms and evolution.

The most common subtype remains iTTP associated with anti-ADAMTS13 autoantibodies, accounting for about 48% of our cohort. Clinical presentation, pregnancy aside, is very consistent with idiopathic iTTP patients. The ADAMTS13 activity assessed by chemiluminescent assay is almost always undetectable (<0.2 IU/dL), indicating the total functional deficiency of the protein in this auto-immune context. This is also supported by ADAMTS13 antigen levels, detectable in most cases, which further validates the predominantly functional nature of the deficiency. Moreover, and as previously reported in acute TTP<sup>36</sup>, ADAMTS13 conformation is shown open, likely blocked in this conformation by anti-ADAMTS13 autoantibodies. The implications in term of management of iTTP are multiple and quite well

illustrated by our study. Plasma exchange was necessary for almost all pregnancy-onset iTTP patients, with only one patient treated by fresh frozen plasma and no plasma exchanges. Immunosuppressive therapies were also very often necessary (mostly corticosteroids and rituximab) to control the disease, as is the case in idiopathic iTTP. Rituximab use during pregnancy raises concern, and while we report a total of three patients who received rituximab with pregnancies ending in live births with no side effects, this very small number of patients should lead to caution. Regarding caplacizumab, there are obviously very few cases as of 2022<sup>49</sup> and caution is also warranted. The follow-up of these iTTP patients shows a natural history close to what is known of idiopathic iTTP patients<sup>33,50</sup>: a risk of relapse that can occur independently of a subsequent pregnancy (11/48, 22.9% relapsed outside of pregnancy) and as such, these patients need lifetime monitoring. During their follow-up, these patients totalized 21 subsequent pregnancies and 11 live births. Only three pregnancies (which all started with either undetectable or very low ADAMTS13 activity) were marked by a TTP relapse. Another reported pregnancy began after pre-emptive rituximab therapy following a relapse and normalization of ADAMTS13 activity: no relapse was reported. As previously reported<sup>22,51</sup>, we believe that these data indicate that beginning a pregnancy with low or undetectable ADAMTS13 activity is associated with a high risk of relapse, while on the other way a normal (or normalized by pre-emptive therapy) ADAMTS13 activity decreases strongly the likelihood of a TTP relapse. Our study also reports one pre-eclampsia with very low ADAMTS13 activity (16 IU/dL). The link between the risk of preeclampsia and TTP has already been suggested<sup>52</sup> albeit not formally proven. Finally, six miscarriages (with normal or undocumented ADAMTS13 activity, no TTP relapse) are also reported: whether a history of TTP increases the odds of miscarriage is unclear.

The second well-defined subtype is cTTP, which is almost exclusively triggered by pregnancy in adult-onset TTP. Clinical presentation is very similar to what we observed in iTTP, and unfortunately no clinical or biological marker appears useful to discriminate these two forms of the disease. A previous study by our group showed that adult-onset cTTP showed a closed ADAMTS13 conformation<sup>44</sup>. Chemiluminescent ADAMTS activity was also higher than in the iTTP group, with even 4 patients reported with > 10 IU/dL chemiluminescent ADAMTS13 activity. Two patients share the same *ADAMTS13* genotype, and carry the R1060W mutation (heterozygous state) and 5 polymorphisms. It appears likely that this genotype leads to greatly reduced albeit perhaps detectable ADAMTS13 activity. The third patient also carries the R1060W mutation (heterozygous state), but a previously undescribed mutation was also found: V88L in the metalloprotease domain. This sequence variation is very likely damaging as this amino acid is highly conserved. The final patient carries the W390X mutation (heterozygous state), previously described as associated with cTTP, and a novel mutation, c.1245-3C>T. The result of this sequence variation on exon 10 splicing are uncertain. This also raises the question of whether a minimal level of ADAMTS13 activity to trigger TTP exists beyond the strictly technical 10 IU/dL threshold. While not all *ADAMTS13* mutations reported in adult-onset cTTP have been characterized, the most frequent one R1060W (72.4% of our cohort) was reported to lead to a severe intracellular retention of an otherwise functional protein<sup>53</sup>. In other terms, it is possible that adult-onset TTP are linked to more or less strictly quantitative ADAMTS13 defects that would need the high and prolonged raise in VWF inherent to pregnancy to lead to TTP. Management data show that the need in plasma is lower than in iTTP patients to attain remission. Moreover, and similarly to other studies

focusing on adult onset cTTP, no TTP bout outside of pregnancy is reported in our cohort, supporting the major role played by high VWF levels during pregnancy to trigger a TTP bout in this context. Eighteen subsequent pregnancies are reported, with one ending in abortion, closely monitored and 14 of which were carried out with prophylactic plasmatherapy. This strategy, in practice in other countries as well<sup>22,54</sup> allowed 12 live births with no relapse, 1 miscarriage with no relapse, and only one relapse (with live birth). On the contrary, the three pregnancies led without prophylactic plasmatherapy all relapsed, with two IUFD and only one live birth. Overall, this strategy of systematically administering weekly or biweekly fresh frozen plasma and closely monitor cTTP pregnancies with multidisciplinary teams appears successful.

The third and last subtype of pregnancy-onset TTP of this study is uTTP, with no detectable anti-ADAMTS13 autoantibodies, representing 25% of our cohort. Clinical features vary compared to the more common iTTP, notably a higher blood pressure, higher proportion of acute kidney failure and higher platelet count. ADAMTS13 activity assessed by chemiluminescent assay shows significantly higher ADAMTS13 activity than in the iTTP group, mainly related to 15 discrepant patients whose ADAMTS13 activity is measured between 12 and 30 IU/dL with the AcuStar assay, with median chemiluminescent ADAMTS13 activity at 12.7 IU/dL. The obvious concern raised by this result is the resulting misdiagnosis of TTP if using a chemiluminescent assay rather than the reference FRETs-VWF73 assay. Another surprising result is the very high proportion of uTTP patients in which ADAMTS13 conformation was found open (77.8%). While an open ADAMTS13 conformation has been described as a hallmark of iTTP, and on the contrary uTTP has been associated with closed conformation of ADAMTS13<sup>18</sup> this result raises question. A hypothesis to consider here is that prolonged (several months) high VWF levels during pregnancy may induce an opening of ADAMTS13 in obstetrical uTTP by a mechanism totally independent of anti-ADAMTS13 antibodies. In other words, open ADAMTS13 in uTTP may be linked to the prolongation of a physiological mechanism rather than to a pathologic blockage of ADAMTS13 cryptic site by specific auto-antibodies. Of note in our former work showing that uTTP was associated with a closed ADAMTS13 conformation, pregnancy was an exclusion criteria<sup>18</sup>. This hypothesis may also partially explain the high rate (15/27, 55.6%) of detectable ADAMTS13 activity between 12 and 30 IU/dL with the chemiluminescent method in spite of a markedly quantitative defect, as open ADAMTS13 intrinsically has a higher activity than closed ADAMTS13. However, the reason why the latter ADAMTS13 activities remain lower than 10 IU/dL with the FRETs-VWF73 assay remains unknown. Maybe the exposure of the VWF73 fragment coated on electromagnetic particles enhances its access to small amounts of active ADAMTS13 when compared to the liquid-phase FRETs-VWF73 assay. In terms of mechanisms supporting ADAMTS13 severe deficiency in uTTP, consumption and/or degradation of ADAMTS13 may be involved. In addition, as degradation of ADAMTS13 could lead to the exposure of the cryptic binding site for 1C4 antibody in the spacer domain<sup>4</sup>, this mechanism may also explain why ADAMTS13 conformation is found open in most of our obstetrical uTTP. Nevertheless, iTTP misdiagnosed as uTTP because of *in vitro* false negative anti-ADAMTS13 autoantibodies (absence of residual free anti-ADAMTS13 IgG, presence of either IgA or IgM) also remains a possibility in this specific subgroup of obstetrical TTP. However, beyond a purely mechanistical approach, pregnancy-onset uTTP differ on a therapeutic level. The management of these patients did not rely as much on

plasma therapy or on immunosuppressive therapy as iTTP patients. The follow-up also shows a very different pattern than iTTP patients: only one out the 26 surviving aTTP relapsed outside of pregnancy and the 3 subsequent pregnancies reported were not marked by any decrease of ADAMTS13 activity. We believe this incredibly low relapse rate backs up our hypothesis of a mechanical (quantitative defect and/or degradation of ADAMTS13) rather than immune mechanism.

Pregnancy-onset TTP remains a tricky diagnosis and a challenging situation to manage, due to the rarity and to the life-threatening nature of the disease. Management of these difficult situations should be done by a multidisciplinary team involving experienced obstetricians, hematologists and intensive care unit specialists. Our study reports the largest cohort of pregnancy onset-TTP and spans 20 years, giving a clear picture of that particular entity of TTP. Three distinct subtypes are singled, differing in key aspects such as the mechanistic leading to ineffective ADAMTS13 and eventually TTP, clinical presentation, management (particularly in terms of plasmatherapy and immunosuppressive therapy) and most importantly follow-up. Beyond iTTP and cTTP which issues of differential diagnosis are more and more well handled, our work highlights obstetrical uTTP as a complex entity. Indeed, uTTP raises several still unanswered questions such as the differential diagnosis with either iTTP or pre-eclampsia/HELLP syndrome and the risk of underdiagnosing TTP on the basis of tricky biological markers (ADAMTS13 activity measured by chemiluminescence, pre-eclampsia biomarkers). In that regard, neither detectable chemiluminescent ADAMTS13 activity nor elevated sFlt-1/PIGF ratio should definitely exclude a TTP diagnosis in an obstetrical context. These data may help to better manage pregnancy-onset TTP and to offer personalized counseling adapted to each patient for subsequent pregnancies.

## References

1. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, et al. Unusually large plasma Factor VIII:Von Willebrand Factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 1982;307(23):1432–1435.
2. Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand Factor-cleaving Protease (ADAMTS13), a Metalloprotease Involved in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *J. Biol. Chem.* 2001;276(44):41059–41063.
3. 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.
4. Ercig B, Arfman T, Hrdinova J, et al. Conformational plasticity of ADAMTS13 in hemostasis and autoimmunity. *J. Biol. Chem.* 2021;297(4):101132.
5. Kim HJ, Xu Y, Petri A, et al. Crystal structure of ADAMTS13 CUB domains reveals their role in global latency. *Sci. Adv.* 2021;7(16):eabg4403.
6. Zhu J, Muia J, Gupta G, et al. Exploring the “minimal” structure of a functional ADAMTS13 by mutagenesis and small-angle X-ray scattering. *Blood.* 2019;133(17):1909–1918.
7. 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):4223–34.
8. 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;118(12):3212–3221.
9. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein, von Willebrand Factor. *Science.* 2009;324(5932):1330.
10. Petri A, Kim HJ, Xu Y, et al. Crystal structure and substrate-induced activation of ADAMTS13. *Nat. Commun.* 2019;10(1):3781.
11. Kremer Hovinga JA, Coppo P, Lämmle B, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2017;3:17020.
12. Joly BS, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;129(21):2836–2846.
13. Sadler JE. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;130(10):1181–1188.
14. Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, et al. ISTH guidelines for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(10):2496–2502.
15. Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. Von Willebrand Factor-Cleaving Protease in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1998;339(22):1578–1584.
16. 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;91(8):2839–2846.
17. Tsai H-M, Lian EC. Antibodies to Von Willebrand Factor-Cleaving protease in acute TTP. *N. Engl. J. Med.* 1998;339(22):1585–1594.
18. Joly BS, Roose E, Coppo P, Vanhoorelbeke K, Veyradier A. ADAMTS13 conformation is closed in non-immune acquired thrombotic thrombocytopenic purpura of unidentified pathophysiology (uTTP). *Haematologica.* 2022;(SE-Letters to the Editor):
19. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature.* 2001;413:488–494.
20. Mariotte E, Azoulay E, Galicier L, et al. Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset

- thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol.* 2016;3(5):237–245.
21. George JN. The thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndromes: overview of pathogenesis (Experience of The Oklahoma TTP-HUS Registry, 1989–2007). *Kidney Int.* 2009;75(SUPPL. 112):S8–S10.
  22. Ferrari B, Peyvandi F. How I treat thrombotic thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Blood.* 2020;136(19):2125–2132.
  23. George JN, Nester CM, McIntosh JJ. Syndromes of thrombotic microangiopathy associated with pregnancy. *Hematology.* 2015;2015(1):644–648.
  24. Delmas Y, Helou S, Chabanier P, et al. Incidence of obstetrical thrombotic thrombocytopenic purpura in a retrospective study within thrombocytopenic pregnant women. A difficult diagnosis and a treatable disease. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2015;15(1):137.
  25. Fakhouri F. Pregnancy-related thrombotic microangiopathies: Clues from complement biology. *Transfus. Apher. Sci.* 2016;54(2):199–202.
  26. Neave L, Scully M. Microangiopathic Hemolytic Anemia in Pregnancy. *Transfus. Med. Rev.* 2018;32(4):.
  27. Coppo P, Veyradier A. TTP in the setting of pregnancy: The story still has to be written. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(10):2775–2777.
  28. Sánchez-Luceros A, Fariás C, Amaral M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb. Haemost.* 2004;92(12):1320–1326.
  29. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, et al. Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: A series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br. J. Haematol.* 2009;144(5):742–754.
  30. Camilleri RS, Scully M, Thomas M, et al. A phenotype-genotype correlation of ADAMTS13 mutations in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura patients treated in the United Kingdom. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10(9):1792–1801.
  31. Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M, et al. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2012;119(24):5888–5897.
  32. Scully M, Thomas M, Underwood M, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy: Presentation, management, and subsequent pregnancy outcomes. *Blood.* 2014;124(2):211–219.
  33. Jiang Y, McIntosh JJ, Reese JA, et al. Pregnancy outcomes following recovery from acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2014;123(11):1674–1680.
  34. Fakhouri F, Scully M, Provot F, et al. Management of thrombotic microangiopathy in pregnancy and postpartum: Report from an international working group. *Blood.* 2020;136(19):2103–2117.
  35. Mirabet M, Blanch S, Puig J, Serra J. Highly sensitive fully automated chemiluminescent immunoassay for rapid quantification of ADAMTS13 activity. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2017;1:1297.
  36. Roose E, Schelpe AS, Joly BS, et al. An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2018;16(2):378–388.
  37. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br. J. Haematol.* 2005;129(1):93–100.
  38. Beranger N, Benghezal S, Joly BS, et al. Diagnosis and follow-up of thrombotic thrombocytopenic purpura with an automated chemiluminescent ADAMTS13 activity immunoassay. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2021;5(1):81–93.



39. 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(4):466–471.
40. 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.
41. Dekimpe C, Roose E, Tersteeg C, et al. Anti-ADAMTS13 autoantibodies in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura do not hamper ELISA-based quantification of ADAMTS13 antigen. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(4):985–990.
42. Mancini I, Valsecchi C, Lotta LA, et al. FRETs-VWF73 rather than CBA assay reflects ADAMTS13 proteolytic activity in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura patients. *Thromb. Haemost.* 2014;112(2):297–303.
43. Hund M, Allegranza D, Schoedl M, et al. Multicenter prospective clinical study to evaluate the prediction of short-term outcome in pregnant women with suspected preeclampsia (PROGNOSIS): study protocol. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14(1):324.
44. Joly BS, Boisseau P, Roose E, et al. ADAMTS13 Gene Mutations Influence ADAMTS13 Conformation and Disease Age-Onset in the French Cohort of Upshaw-Schulman Syndrome. *Thromb. Haemost.* 2018;118(11):1902–1917.
45. Scully M. How to evaluate and treat the spectrum of TMA syndromes in pregnancy. *Hematology*. 2021;2021(1):545–551.
46. Van Dorland HA, Taleghani MM, Sakai K, et al. The International Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Registry: Key findings at enrollment until 2017. *Haematologica*. 2019;104(10):2107–2115.
47. Rana S, Hacker MR, Modest AM, et al. Circulating Angiogenic Factors and Risk of Adverse Maternal and Perinatal Outcomes in Twin Pregnancies With Suspected Preeclampsia. *Hypertension*. 2012;60(2):451–458.
48. Zeisler H, Llorca E, Chantraine F, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(1):13–22.
49. Kühne L, Völker LA, Hagmann H, et al. First use of the anti-VWF nanobody caplacizumab to treat iTTP in pregnancy. *Br. J. Haematol.* 2022;196(3):e30–e33.
50. Vesely SK. Life after acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: Morbidity, mortality, and risks during pregnancy. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(S1):S216–S222.
51. Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, et al. ISTH guidelines for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(10):2496–2502.
52. Stepanian A, Cohen-Moatti M, Sanglier T, et al. Von Willebrand Factor and ADAMTS13. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(7):1703–1709.
53. Camilleri RS, Cohen H, Mackie IJ, 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.
54. Sakai K, Fujimura Y, Nagata Y, et al. Success and limitations of plasma treatment in pregnant women with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(11):2929–2941.

Cette étude présente la plus importante cohorte à l'échelle internationale de patientes présentant un épisode inaugural de PTT en contexte obstétrical. La documentation de biomarqueurs innovants (activité d'ADAMTS13 par une méthode chimiluminescente, conformation d'ADAMTS13, ratio sFlt-1/PIGF) et le suivi au long cours des patientes sont deux points forts de notre étude. Deux messages importants émergent de l'étude de l'activité d'ADAMTS13 par méthode chimiluminescente et du ratio sFlt-1/PIGF. Nous rapportons une proportion importante (20/108, 18,5%) de discordances entre l'activité d'ADAMTS13 mesurée par la méthode de référence FRETs-VWF73 (activité d'ADAMTS13 < 10 UI/dL) et celle mesurée par la méthode chimiluminescente (activité d'ADAMTS13 >10 UI/dL mais < 30 UI/dL), pouvant conduire à une exclusion erronée du diagnostic de PTT. Nous rapportons également une proportion importante de patientes avec un ratio sFlt-1/PIGF élevé (26/71, 36,6%), pouvant également compliquer le diagnostic différentiel entre un PTT et une pré-éclampsie. Une activité d'ADAMTS13 détectable par chimiluminescence et/ou un ratio sFlt-1/PIGF élevé ne doivent donc en aucun cas conduire à eux-seuls à une exclusion de PTT. Le diagnostic différentiel du PTT vis-à-vis des autres MAT retrouvées en contexte obstétrical reste donc un difficile et doit reposer sur la mesure de l'activité d'ADAMTS13 par une méthode de référence.

Notre étude renforce les connaissances sur la présentation clinico-biologique et le suivi des grossesses ultérieures chez les patientes atteintes de PTTi et de PTTc. L'encadrement médical des grossesses ultérieures pour limiter le risque de rechute, par une normalisation de l'activité d'ADAMTS13 avant une grossesse pour les PTTi et par une plasmathérapie prophylactique chez les PTTc, est crucial. Nous décrivons pour la première fois l'entité PTTu obstétrical, qui se distingue d'une part des PTTu non obstétricaux et d'autre part des PTTi/PTTc obstétricaux. Une différence importante est la conformation d'ADAMTS13, qui est fréquemment ouverte dans le PTTu obstétrical, similairement au PTTi (idiopathique comme obstétrical) à l'inverse du PTTu non obstétrical où la conformation d'ADAMTS13 est fermée. Les implications en termes de physiopathologie sont multiples et à l'heure actuelle non résolues. La spécificité du contexte obstétrical de cette forme de PTTu, pour laquelle la conformation d'ADAMTS13 est ouverte, suggère une implication de la persistance de taux élevés de VWF propre à la grossesse. Le risque de rechute extrêmement faible en comparaison des PTTi/PTTc obstétricaux renforce l'hypothèse d'un mécanisme différent (ni auto-immun, ni constitutionnel). Le manque de recul et la prudence imposent cependant une surveillance clinico-biologique des grossesses ultérieures au même titre que les PTTi/PTTc obstétricaux.

L'étude de cette cohorte révèle par ailleurs la forte disparité de présentation clinique pouvant exister, même au sein de chaque entité. A phénotype biologique (voire génotype) d'ADAMTS13 identique, il peut donc exister d'autres facteurs modulateurs expliquant en partie cette variabilité inter-individuelle. La recherche de facteurs de risque constitutionnels en dehors du gène *ADAMTS13* est à l'heure actuelle mal connue, que ce soit dans le PTTi ou dans le PTTc, et fait l'objet du prochain volet de cette thèse.

### **III. Recherche de facteurs de risque constitutionnels impliqués dans le purpura thrombotique thrombocytopénique obstétrical**

#### **Quatrième publication (travail en cours)**

#### **Genetic risk factors for congenital and acquired immune thrombotic thrombocytopenic purpura.**

En cours de soumission

Nicolas Béranger<sup>1,2</sup>, Pierre Boisseau<sup>3</sup>, Corinne Collet<sup>4,5</sup>, Paul Coppo<sup>6</sup>, Agnès Veyradier<sup>1,2</sup>, Bérangère Joly<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Service d'Hématologie biologique, CRMR des MAT-laboratoire ADAMTS13, FSMR MaRIH, CRMR de la maladie de Willebrand, FSMR MHEMO, DMU BioGeM, Hôpital Lariboisière, AP-HP.Nord, Université Paris Cité, Paris, France

<sup>2</sup> EA-3518 Recherche clinique en hématologie, immunologie et transplantation, Groupe MicroAngiopathies Thrombotiques, VWF et ADAMTS13, Institut de Recherche Saint Louis - Université de Paris, Paris, France

<sup>3</sup> Service de génétique, CHU de Nantes, Nantes, France

<sup>4</sup> Département de Génétique, UF de Génétique Moléculaire, Hôpital Robert Debré, APHP.Nord, Université Paris Cité, Paris, France

<sup>5</sup> Inserm U1132, Biologie de l'os et du cartilage, Université Paris Cité, Paris, France

<sup>6</sup> Service d'Hématologie, Centre de référence des microangiopathies thrombotiques (CNR-MAT), DMU ORPHé, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP.Sorbonne Université, Paris, France

Le 3<sup>ème</sup> chapitre de ce mémoire est consacré à la recherche de facteurs de risque constitutionnels impliqués dans le PTT obstétrical. Même si la partie technique du travail est achevée, la partie analytique est en cours d'exploitation à l'heure de l'écriture de ce mémoire et elle fera donc l'objet de perspectives. Ce chapitre est donc présenté ci-après sous la forme d'un article préliminaire en français.

## Introduction et rationnel de l'étude

La recherche de facteurs de risque constitutionnels impliqués dans le PTTi ou le PTTc (hors gène *ADAMTS13*) est à l'heure actuelle un axe de recherche très peu exploité. En 2008, Camilleri et al.<sup>139</sup>, rapportent une prévalence élevée (11,3%) de la mutation p.Arg1060Trp (R1060W, rs142572218) du gène *ADAMTS13* dans une cohorte de 53 patients atteints de PTT de révélation adulte (qu'il s'agisse de PTTi ou de PTTc). Bien que cette mutation soit aujourd'hui parfaitement associée au PTTc de révélation obstétricale, sa présence chez 3 patients atteints de PTTi dans cette étude de 2008 suggère que cette mutation pourrait être un facteur de risque de PTTi. A notre connaissance, aucune autre étude portant sur le rôle de la mutation R1060W du gène *ADAMTS13* dans le PTTi n'a été publiée. De plus, au vu des connaissances récentes sur la conformation d'*ADAMTS13*, cette hypothèse posée par Camilleri et al.<sup>139</sup> en 2008 mérite d'être explorée. En effet, la mutation R1060W (rs142572218) du gène *ADAMTS13* est localisée dans la partie C-terminale de la protéine *ADAMTS13*, au sein de son domaine TSP1-7. La principale hypothèse retenue actuellement pour expliquer la physiopathologie de l'auto-immunité anti-*ADAMTS13* dans le PTTi peut être résumée par la séquence suivante : une première vague d'auto-anticorps ouvrant *ADAMTS13* (« *opening* » *antibodies*) fait passer *ADAMTS13* d'une conformation fermée à une conformation ouverte en se fixant sur sa partie C-terminale (derniers domaines TSP1 et domaines CUB), ce qui conduit à une exposition des domaines cryptiques d'*ADAMTS13* (notamment son domaine *spacer* et ses séquences flanquantes) ; l'exposition de ces domaines cryptiques induit la formation d'une seconde vague d'auto-anticorps anti-*ADAMTS13* dits inhibiteurs et clairants (« *inhibiting and clearing* » *antibodies*) qui conduisent au déficit fonctionnel sévère en *ADAMTS13*<sup>194,198,199,365,366</sup>. Nous pouvons supposer qu'une mutation de la partie C-terminale d'*ADAMTS13* comme la R1060W pourrait favoriser le processus d'ouverture d'*ADAMTS13* (soit en créant un néo-épitope plus affiné pour les auto-anticorps ouvrants soit en induisant elle-même une ouverture partielle d'*ADAMTS13*) et *in fine*, être un facteur de risque de PTTi en facilitant ainsi le développement d'anticorps inhibiteurs et clairants. Dans un premier volet de ce travail, nous avons donc recherché rétrospectivement la mutation R1060W dans une cohorte de 98 PTTi.

D'autre part, près de 200 mutations du gène *ADAMTS13* ont aujourd'hui été identifiées comme responsables de PTTc<sup>367</sup>, mais l'existence de variations de séquence d'autres gènes pouvant être associées à cette pathologie reste mal connue. Si le caractère fortement sporadique des mutations d'*ADAMTS13* associées au PTTc rend difficile les confrontations génotype-phénotype<sup>137</sup>, le suivi de ces patients au long cours met en évidence de grandes disparités tant dans la présentation clinique initiale qu'au cours du suivi. Cette disparité est particulièrement visible dans le groupe PTTc de révélation obstétricale. En effet, les études des cohortes françaises<sup>138</sup> et britanniques<sup>155</sup> ont montré une prévalence particulièrement importante (entre 24 et 66% des patientes) de la mutation R1060W du gène

*ADAMTS13*. Pourtant, même les patientes porteuses de la mutation R1060W à l'état homozygote ont des présentations cliniques différentes, suggérant le rôle d'autres facteurs. Un rôle modulateur de polymorphismes de gènes codant pour des protéines impliquées dans la physiopathologie du PTT pourrait en partie expliquer cette variabilité importante. Dans cette étude, nous avons recherché des variations de séquence des gènes *VWF* (codant pour le facteur Willebrand), *F8* (codant pour le facteur VIII), *GPIBA* (codant pour la glycoprotéine GPIb $\alpha$  plaquettaire), *GPIBB* (codant pour la GPIb $\beta$  plaquettaire), *ITGA2B* (codant pour la chaîne  $\alpha$ <sub>IIb</sub> de la glycoprotéine  $\alpha$ IIb $\beta$ <sub>3</sub> plaquettaire) et *ITGB3* (codant pour la chaîne  $\beta$ <sub>3</sub> de la glycoprotéine  $\alpha$ IIb $\beta$ <sub>3</sub> plaquettaire) dans une cohorte de PTTc de révélation adulte obstétricale.

## Patients, matériel et méthodes

Conformément à la législation en vigueur, le consentement éclairé de chaque patient (ou de son représentant légal) accompagne le prélèvement d'ADN dédié.

### Recherche de la mutation R1060W du gène *ADAMTS13* dans une cohorte d'adultes atteints de PTTi

Quatre-vingt-dix-huit ADN de patients atteints de PTTi de la biobanque du CNR-MAT ont été séquencés. Le séquençage de l'exon 24 du gène *ADAMTS13* est effectué par l'automate 3130 Genetic Analyzer 16-capillary® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis), par la méthode de Sanger. La séquence est analysée sur le logiciel fournisseur (Sequencing Analysis® Software v7.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis).

### Recherche de variations de séquence des gènes *VWF*, *F8*, *GPIBA*, *GPIBB*, *ITGA2B*, *ITGB3* dans une cohorte de patientes atteintes de PTTc révélé en contexte obstétrical.

La recherche de variations de séquences des gènes *VWF*, *F8*, *GPIBA*, *GPIBB*, *ITGA2B* et *ITGB3* a été effectuée par séquençage haut-débit. Vingt ADN de patientes atteintes de PTTc de la biobanque du CNR-MAT ont été séquencés. L'analyse bio-informatique a été réalisée avec le logiciel SeqPilot 5.1.0. (JSI medical systems®) et permet de détecter les substitutions nucléotidiques, les insertions/délétions et les grands réarrangements. Les variants identifiés absents ou dont la fréquence allélique est inférieure à 15% dans les bases de données dbSNP, 1000 Genomes, ClinVar et gnomAD ont été analysés sur les logiciels Alamut®, Poly-Phen-2® et SIFT® pour prédire leur caractère délétère selon les recommandations de l'*American College of Medical Genetics* (ACMG). La nomenclature utilisée respecte les règles du *Human Genome Variation Society* (HGVS).

## Résultats

### Recherche de la mutation R1060W du gène *ADAMTS13* dans une cohorte d'adultes atteints de PTTi

Aucun des 98 patients séquencés ne présente la mutation R1060W (ni à l'état hétérozygote, ni à l'état homozygote) ni de variation de séquence de l'exon 24 du gène *ADAMTS13*.

### Recherche de variations de séquence des gènes *VWF*, *F8*, *GPIBA*, *GPIBB*, *ITGA2B*, *ITGB3* dans une cohorte de patientes atteintes de PTTc révélé en contexte obstétrical

Un total de 32 variations de séquence inconnues des bases de données ou dont la fréquence allélique était inférieure à 15% a été retrouvé parmi l'ensemble nos 20 patientes atteintes de PTTc à révélation adulte obstétricale. Ces variations de séquence se déclinent en 15 variations pour le gène *VWF*, 3 variations pour le gène *F8*, 5 variations pour le gène *GPIBA*, aucune variation pour le gène *GPIBB*, 5 variations pour le gène *ITGA2B* et 4 variations pour le gène *ITGB3*. Ces variations de séquence sont présentées dans le **Tableau 1, page suivante**.

La majorité des variations de séquence identifiées sont classées ACMG1. Néanmoins, notre étude identifie 9 variants classés ACMG 3 (3 dans le gène *VWF*, 2 dans le gène du *F8*, 1 dans le gène *GPIBA* et 3 dans le gène *ITGA2B*) et 1 variant classé ACMG2 (dans le gène *VWF*). Parmi les variants classés ACMG2 ou ACMG3 qui n'ont jamais été répertoriés dans des cohortes d'intérêt spécifiques, nous retenons les 6 variants suivants. Le variant rs79275181 du gène *VWF* (dont la fréquence allélique publiée est de 4,35%) n'a jamais été retrouvé dans la cohorte de patients du Centre de Référence de la Maladie de Willebrand et il est retrouvé chez 3 patientes de notre cohorte (fréquence allélique de 15%). Le variant rs216321 du gène *VWF*, dont la fréquence allélique publiée est de 8,9% est retrouvé chez 100% de nos patientes, dont 16 (16/20 = 80%) à l'état homozygote. Les variants rs782274577 et rs781962724 du gène *F8* n'ont jamais été retrouvés dans la cohorte de patients hémophiles A du CHU de Nantes. Les variations de séquence c.1100G>T et c.24G>T du gène *ITGA2B* n'ont jamais été décrites précédemment.

Les variations de séquence classées ACMG1 et/ou dont la fréquence dans notre cohorte est comparable à la fréquence dans la population générale et n'ayant fait l'objet d'aucune publication d'intérêt ne paraissent pas pertinentes à étudier.

**Tableau 1. Variations de séquence des gènes VWF, F8, GPIBA, GPIBB, ITGA2B et ITGB3 identifiés dans la cohorte de PTTc de révélation obstétricale.**

La couleur de chaque rsID correspond à son classement selon les critères ACMG :

- Vert : ACMG 1 correspond à un variant bénin (probabilité de la pathogénicité < 1%)
- Jaune : ACMG 2 correspond à un variant probablement bénin (probabilité de la pathogénicité comprise entre 1 et 10%)
- Orange : ACMG 3 correspond à un variant dont la signification est incertaine (probabilité de pathogénicité comprise entre 10 et 90%)

| Gène                    | Variation de séquence codante                                 | Variation de séquence protéique | rsID        | Fréquence dans la littérature | Fréquence dans la cohorte |
|-------------------------|---|---------------------------------|-------------|-------------------------------|---------------------------|
| <b>VWF</b>              | c.4196G>A   | p.Arg1399His                    | rs1800382   | 0,01256                       | 0,05                      |
|                         | c.5049A>C   | p.Ala1683=                      | rs79275181  | 0,04350                       | 0,15                      |
|                         | c.4414G>C   | p.Asp1472His                    | rs1800383   | 0,07644                       | 0,1                       |
|                         | c.2555A>G   | p.Gln852Arg                     | rs216321    | 0,08941                       | 1                         |
|                         | c.4693G>T   | p.Val1565Leu                    | rs1800385   | 0,09360                       | 0,1                       |
|                         | c.3414C>T   | p.Asn1138=                      | rs560397436 | 0,03000                       | 0,5                       |
|                         | c.1945+24C>T  | -                               | rs61908661  | 0,05219                       | 0,15                      |
|                         | c.6063+25G>A  | -                               | rs3741906   | 0,08260                       | 0,1                       |
|                         | c.7288-21C>T  | -                               | rs3819539   | 0,07532                       | 0,1                       |
|                         | c.7288-19C>T  | -                               | rs3819540   | 0,05826                       | 0,1                       |
|                         | c.1-20C>T   | -                               | rs41276742  | 0,01515                       | 0,05                      |
|                         | c.7771-13C>T  | -                               | rs11063962  | 0,06178                       | 0,05                      |
|                         | c.7887+12T>C  | -                               | rs55687637  | 0,00991                       | 0,1                       |
|                         | c.4665A>C   | p.Ala1555=                      | rs1800384   | 0,08638                       | 0,1                       |
| c.1946-17_1946-15dupTCT | -   | rs10622288                      | 0           | 0,1                           |                           |
| <b>F8</b>               | c.4252A>C   | p.Ile1418Leu                    | rs782274577 | 0                             | 0,05                      |
|                         | c.2810A>G   | p.Asp937Gly                     | rs781962724 | 0                             | 0,05                      |
|                         | c.3864A>C   | p.Ser1288=                      | rs1800292   | 0,09751                       | 0,2                       |
| <b>GPIBA</b>            | c.1252G>A   | p.Ala418Thr                     | rs759216138 | 0                             | 0,1                       |
|                         | c.1311_1349   | p.Ser441_Thr453del              | rs574786279 | 0                             | 0,5                       |
|                         | c.482C>T  | p.Thr161Met                     | rs6065      | 0,08935                       | 0,1                       |
|                         | c.1272G>A   | p.Pro424=                       | rs868035529 | 0                             | 0,1                       |
| c.1074A>F               | p.Arg358=   | rs6067                          | 0,03960     | 0,05                          |                           |
| <b>GPIBB</b>            | Aucune variation de séquence détectée dans la cohorte étudiée |                                 |             |                               |                           |
| <b>ITGA2B</b>           | c.439C>G  | p.Leu147Val                     | rs76066357  | 0,01264                       | 0,1                       |
|                         | c.1100G>T   | p.Gly367Val                     | N/A         | 0                             | 0,05                      |
|                         | c.24G>T   | p.Leu8=                         | N/A         | 0                             | 0,05                      |
|                         | c.2094+13C>T  | -                               | rs12938868  | 0,02729                       | 0,05                      |
| <b>ITGB3</b>            | c.176T>C  | p.Leu59Pro                      | rs5918      | 0,14804                       | 0,35                      |
|                         | c.882T>C  | p.Pro294=                       | rs5919      | 0,08437                       | 0,2                       |
|                         | c.939+22A>G   | -                               | rs13306478  | 0,05778                       | 0,1                       |
|                         | c.1914-19T>C  | -                               | rs11870252  | 0,08311                       | 0,15                      |
|                         | c.-7G>C   | -                               | rs117052258 | 0,02365                       | 0,05                      |



## Discussion

### Recherche de la mutation R1060W du gène *ADAMTS13* dans une cohorte d'adultes atteints de PTTi

L'absence de la mutation R1060W dans notre cohorte de PTTi semble discordante par rapport à la prévalence de 11,3% retrouvée par l'étude de Camilleri<sup>352</sup>. Plusieurs pistes d'explication sont à évoquer. Tout d'abord, la cohorte de 53 patients étudiée par Camilleri en 2008 ne différencie pas, comme communément admis aujourd'hui, les PTTc des PTTi, qui sont englobés sous une entité appelée PTT de révélation adulte dans la publication. Parmi les 6 patients porteurs de cette mutation, 3 patientes correspondent à des PTT obstétricaux révélés à l'occasion d'une première grossesse, sans IgG anti-ADAMTS13 détectables. Une seule patiente est homozygote pour la mutation R1060W, les deux autres sont porteuses de cette mutation à l'état hétérozygote sans autre mutation du gène *ADAMTS13*. Le séquençage du gène *ADAMTS13* réalisé en 2008 pourrait toutefois avoir été pris en défaut compte tenu des limites techniques de l'époque et ne pas avoir mis en évidence d'autre mutation délétère. Depuis le début des années 2010, il est largement admis que la mutation R1060W est associée au PTTc de révélation obstétricale. Ainsi, ces 3 patientes correspondent très vraisemblablement à cette entité PTTc alors méconnue. Les observations des 3 autres patients porteurs de la mutation R1060W (à l'état hétérozygote) sont en revanche plus intrigantes : deux sont des hommes et les 3 patients ont présenté un PTT idiopathique associé à des IgG anti-ADAMTS13 à titre significatif. Aucune autre mutation délétère du gène *ADAMTS13* n'a été retrouvée, avec cependant la réserve qu'imposent les limites techniques de 2008. De façon systématique, il faut envisager une caractérisation phénotypique erronée de ces patients : la technique maison de recherche et de titrage des IgG anti-ADAMTS13 peut avoir été prise en défaut (rendu de faux positifs), ce qui *in fine* permettrait de rectifier le diagnostic de ces patients en PTTc. Cependant, au cours du suivi et après traitement par rituximab, la patiente de sexe féminin est caractérisée par une négativation des IgG anti-ADAMTS13 et une augmentation à 30 UI/dL de l'activité d'ADAMTS13. Aucune donnée de suivi n'est malheureusement disponible pour les deux autres patients (de sexe masculin). Cette observation semble davantage compatible avec un vrai PTTi, pouvant simultanément et peut-être fortuitement, être porteur de la mutation R1060W du gène *ADAMTS13* à l'état hétérozygote. La caractérisation des recombinants ADAMTS13 portant la mutation R1060W à l'état homozygote révèle une rétention intracellulaire quasi-totale entraînant un déficit quantitatif sévère<sup>352</sup>. L'activité d'ADAMTS13 en rémission à 30 UI/dL présentée par la patiente rapportée semble donc cohérente avec une mutation R1060W à l'état hétérozygote. En 2022, la fréquence allélique de ce variant retrouvé essentiellement dans la population caucasienne est estimée à 0,0008 (ClinVar, [www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar)). Cette proportion relativement élevée compte tenu du caractère sporadique des autres mutations d'*ADAMTS13* associées au PTTc pourrait expliquer sa présence vraisemblablement fortuite dans des tableaux de PTTi. Néanmoins, la description par Camilleri et al. de 3 cas de PTTi porteurs de la mutation R1060W à l'état hétérozygote / 53 patients PTT de révélation adulte reste surprenante dans la mesure où cette association n'a été rapportée par aucune autre équipe depuis cette publication de 2008 et que cette donnée est confirmée par l'étude de notre cohorte de 98 PTTi. De plus, le suivi sur 20 ans de notre cohorte obstétricale de PTTc porteurs de la mutation R1060W n'a montré aucune apparition d'IgG anti-ADAMTS13, ce qui permet d'éliminer à la

fois un processus d'allo-immunisation et l'apparition d'une auto-immunité anti-ADAMTS13 favorisés par cette mutation particulière.

Finalement, il nous paraît prudent de conclure que, même si la mutation R1060W à l'état hétérozygote peut être théoriquement un facteur de susceptibilité supplémentaire de développer une poussée aiguë de PTT à l'échelle individuelle (puisque'elle entraîne une activité d'ADAMTS13 de base partiellement déficitaire), sa très faible fréquence dans la population générale et son absence dans notre cohorte de 98 PTTi ne rendent rationnelles ni une étude élargie dans le PTTi ni *a fortiori* une recommandation de séquençage de screening chez les patients PTTi. Autrement dit, une relation de cause à effet entre la présence de la mutation R1060W d'ADAMTS13 à l'état hétérozygote et la susceptibilité à développer des auto-anticorps antiADAMTS13 induisant un PTTi, est finalement extrêmement peu probable. Cette conclusion est d'ailleurs indirectement confortée par le travail récent mené par notre groupe dans le PTTc<sup>137</sup> qui montre que les variants d'ADAMTS13 R1060W hétérozygotes comme homozygotes, sont associés à une conformation fermée d'ADAMTS13. En effet, ce résultat va à contresens de notre hypothèse formulée au départ dans le rationnel de cette étude, où le variant R1060W de la partie-C terminale d'ADAMTS13 aurait pu en soi induire une ouverture partielle de la conformation d'ADAMTS13 favorisant la séquence physiopathologique menant au PTTi. Cependant, au cas par cas et uniquement dans ce schéma individuel, il pourrait être envisageable de séquencer le gène *ADAMTS13* (à la recherche d'une mutation hétérozygote) chez un patient PTTi s'il conserve de manière très prolongée un déficit partiel en ADAMTS13 en rémission, cela afin de ne pas prolonger inutilement un traitement immunosuppresseur et aussi à visée d'enquête familiale pour un éventuel conseil génétique. Cette approche a déjà été évoquée chez une patiente atteinte de PTTi obstétrical et porteuse d'une autre mutation hétérozygote du domaine C-terminal d'ADAMTS13 (R1177Q)<sup>368</sup>.

#### Recherche de variations de séquence des gènes *VWF*, *F8*, *GPIBA*, *GPIBB*, *ITGA2B*, *ITGB3* dans une cohorte de patientes atteintes de PTTc révélé en contexte obstétrical

Cette étude est la première à rechercher des facteurs de risque constitutionnels en dehors du gène *ADAMTS13* dans le PTTc de révélation obstétricale. A ce stade de notre travail, deux variants apparaissent d'intérêt. Tout d'abord, le variant rs216321 du gène du *VWF* est présent chez toutes les patientes de la cohorte dont 80% à l'état homozygote, avec une sur-représentation considérable compte tenu de sa fréquence allélique de référence (8,9%). Ce variant a fait l'objet de plusieurs publications étudiant son rôle dans la modulation des taux de VWF:Ag<sup>369-372</sup>. Sa caractérisation phénotypique publiée par Van Loon et al<sup>371</sup> permet d'associer sa présence à l'état homozygote avec une augmentation du taux de VWF:Ag de l'ordre de 40%. Cette mutation aggraverait donc le déséquilibre VWF/ADAMTS13 observé physiologiquement au cours de la grossesse et par conséquent, l'aptitude à développer des microthrombi riches en VWF et plaquettes dans le PTTc de révélation obstétricale. De façon surprenante, ce variant a également été associé à un risque plus élevé de pré-éclampsie<sup>373</sup> chez les patientes présentant un génotype du *VWF* différent de leur fœtus. La pertinence de cette association dans le contexte du PTTc obstétrical reste à déterminer.

Le second variant d'intérêt identifié est le polymorphisme rs5918 du gène *ITGB3* (malgré sa faible probabilité de pathogénicité selon les critères ACMG), présent chez 7 de nos patientes PTTc obstétrical (7/20, 35%) alors que la fréquence allélique de référence est de 14,8%. Décrit dès 1996 comme facteurs de risque associé au risque d'infarctus du myocarde du sujet jeune<sup>374,375</sup>, des études complémentaires depuis les années 2010 ont permis d'affiner le rôle modulateur de ce polymorphisme<sup>376-380</sup>. Cette variation de séquence semble associée à une augmentation de la réactivité de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_{III}$  en réponse à la liaison des plaquettes au fibrinogène ou au VWF. De façon surprenante, ce variant est également retrouvé comme facteur de risque de fausses couches spontanées récurrentes<sup>381</sup>.

Une combinaison de plusieurs variants de signification indéterminée dont la fréquence est inconnue ou décrits pour la première fois sont retrouvés chez une seule patiente dans notre étude : rs782274577 et rs781962724 (gène *F8*), c.1100G>T et c.24G>T (gène *ITGA2B*). Même si ces variations de séquence pourraient, à l'échelle individuelle, avoir un rôle dans l'histoire naturelle de la pathologie, il reste difficile de le mettre en évidence compte tenu du caractère incertain de leur pathogénicité et de leur rareté.

L'étude de la pertinence des autres variations de séquence retrouvées est un travail inachevé. Le rôle modulateur de ces différentes variations de séquence sur la physiopathologie du PTT et *in fine* sur la présentation clinique de chaque patiente à l'échelle individuelle pourrait conduire à une classification en sous-groupes de patientes de sévérité variable.

## DISCUSSION

Ce travail de thèse de sciences est dédié à l'étude du PTT en contexte obstétrical, une entité finalement fréquente au sein de la maladie rare PTT. Le PTT obstétrical se distingue par un diagnostic souvent difficile, des mécanismes physiopathologiques mal connus et de grandes spécificités de prise en charge. Ce travail de doctorat permet de dessiner un portrait de vingt ans d'expériences du CNR-MAT qui éclaire ces trois volets de questions sur le PTT obstétrical.

Le premier volet de ce travail est consacré au **diagnostic du PTT en contexte obstétrical**.

Les scores de probabilité clinico-biologique développés pour le dépistage de PTT idiopathique (French score et PLASMIC score) sont performants, mais n'ont pas été validés en contexte obstétrical, où le diagnostic différentiel avec d'autres MAT peut être particulièrement difficile.

Les facteurs antiangiogéniques (sFlt-1) et proangiogéniques (PlGF) sont des biomarqueurs potentiellement disponibles en urgence permettant, devant un tableau clinique évocateur, de confirmer le diagnostic de pré-éclampsie avec une spécificité élevée<sup>310-312</sup>. Nous avons pour la première fois étudié le ratio sFlt-1/PlGF dans la cohorte de PTT obstétrical et rapporté de manière inattendue une élévation du ratio sFlt-1/PlGF à la phase aiguë du PTT dans plus d'un tiers des cas, évoquant une pré-éclampsie. Ce résultat inattendu confirme le chevauchement clinico-biologique entre PTT et pré-éclampsie et indique que la valeur diagnostique d'un ratio sFlt-1/PlGF élevé peut être prise en défaut dans un tableau de PTT obstétrical. Un ratio sFlt-1/PlGF élevé ne peut donc pas être un argument suffisant pour exclure un diagnostic de PTT obstétrical et le diagnostic de certitude repose sur la mesure d'une d'activité d'ADAMTS13 effondrée, le plus souvent rétrospectivement.

L'instauration d'une prise en charge adaptée dépend intimement du diagnostic de MAT obstétricale, et de nouvelles méthodes de mesure de l'activité d'ADAMTS13 ont été mises au point afin de poser un diagnostic rapide et d'initier sans délai un traitement adapté. Nous avons évalué un TROD développé pour dépister un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13. Les performances techniques et diagnostiques du dispositif évalué ne sont pas optimales et ne permettent pas aujourd'hui son utilisation dans le cadre des soins.

Nous avons également évalué une méthode entièrement automatisée de mesure de l'activité d'ADAMTS13 par chimiluminescence (ECLIA) sur un automate d'hémostase spécialisée déjà implanté dans plusieurs laboratoires hospitaliers d'hémostase en France. Les performances analytiques et diagnostiques de cette méthode sont très satisfaisantes, avec l'avantage évident de la simplicité technique et par conséquent, une adéquation avec les situations urgentes. Dans un contexte de suspicion de PTT idiopathique, le dépistage grâce aux scores de probabilité clinico-biologique, conforté rétrospectivement par la documentation de l'activité d'ADAMTS13, conduit à l'instauration probabiliste des traitements du PTT. En revanche, la disponibilité d'une mesure de l'activité d'ADAMTS13 en urgence présente un intérêt certain en contexte obstétrical où la conduite à tenir est moins évidente. Notre étude confirme les performances de cette méthode à diagnostiquer un PTT idiopathique ou associé à un contexte clinique particulier et à évaluer l'efficacité d'un traitement personnalisé par caplacizumab (robustesse analytique dans la zone 10-25 UI/dL). Il est intéressant de noter qu'à ce jour,

plusieurs laboratoires en France ont fait le choix de cette méthode pour la détermination de l'activité d'ADAMTS13, soulignant ses nombreux avantages. Toutefois, plusieurs limites doivent être énoncées. Le coût par examen avec la méthode ECLIA est très élevé, ce qui limite son utilisation. Notre étude met également en lumière une proportion faible mais non négligeable de discordances diagnostiques (sensibilité pour le diagnostic de PTT estimée à 90%), en particulier en contexte obstétrical. Une exclusion à tort de PTT en contexte obstétrical est rapportée essentiellement chez des patientes PTTc ou PTTu. Les cliniciens et biologistes prenant en charge ces patientes doivent être avertis des limites de cet outil diagnostique. Devant un tableau clinico-biologique de MAT obstétricale pouvant évoquer un PTT et pour lequel l'activité d'ADAMTS13 est supérieure à 10 UI/dL par la méthode ECLIA, un contrôle de l'activité d'ADAMTS13 par la méthode de référence FRETs-VWF73 doit être réalisé.

Un autre point d'intérêt pour le diagnostic du PTT en contexte obstétrical concerne le seuil de positivité des IgG anti-ADAMTS13. Le titrage des IgG anti-ADAMTS13 par une trousse commerciale ELISA est plus sensible que la recherche d'une activité inhibitrice circulante. Le seuil de positivité du fournisseur est de 15 U/mL, mais une étude menée au laboratoire ADAMTS13 du CNR-MAT sur 200 sujets sains a conduit à relever ce seuil à 25 U/mL pour en augmenter la spécificité (données non publiées). Notre expérience depuis cette dernière décade conforte le choix de ce seuil à 25 U/mL. Toutefois, l'étude de la cohorte de patientes atteintes de PTT obstétrical met en évidence que le seuil de 15 U/mL paraît plus pertinent au regard des tableaux clinico-biologiques, de la réponse au traitement immunosuppresseur et de la tendance à la rechute. Cet abaissement à 15 U/mL pourrait malgré tout conduire à mal classer des patientes PTTc présentant parfois des titres d'IgG anti-ADAMTS13 à la limite du seuil de positivité. Cette observation soulève donc la question de définir différents seuils en fonction du contexte clinique. Cette notion de variation de seuils de positivité pour une recherche d'auto-anticorps en fonction d'un contexte clinique semble peu exploitée dans le champ des maladies auto-immunes mais elle pourrait conduire à une meilleure classification des patients et *in fine* à une prise en charge thérapeutique plus adaptée en particulier sur l'usage d'immunosuppresseurs.

Dans un deuxième volet, ce travail a permis de mieux démembrer **les mécanismes physiopathologiques** du PTT obstétrical, notamment grâce à l'utilisation de biomarqueurs innovants. Ainsi, trois groupes de physiopathologies distinctes émergent de notre cohorte de PTT obstétricaux.

Le premier groupe correspond au **PTTi obstétrical** (environ la moitié des patientes), qui présente le même phénotype biologique à la phase aiguë que le PTTi idiopathique : activité d'ADAMTS13 effondrée quelle que soit la méthode de mesure, présence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13, antigène d'ADAMTS13 très diminué et conformation d'ADAMTS13 ouverte. La conformation ouverte d'ADAMTS13 conduisant à l'exposition de sites cryptiques cibles des auto-anticorps anti-ADAMTS13 pourrait être à l'origine de la rupture de tolérance immunitaire conduisant au PTTi. Le mécanisme menant à l'ouverture initiale d'ADAMTS13 reste cependant inconnu, mais l'hypothèse prévalente à l'heure actuelle repose sur une succession de vagues d'anticorps anti-ADAMTS13, les premiers ciblant l'extrémité C-terminale d'ADAMTS13 de façon analogue au domaine D4CK du VWF<sup>194,198,199,365,366</sup>. Ce mécanisme pourrait aussi être le *primum movens* du PTTi obstétrical. Toutefois, le contexte obstétrical a la particularité d'être associé à un déséquilibre de la balance

VWF/ADAMTS13 s'étendant sur plusieurs mois. Ainsi, il pourrait être pertinent de documenter la conformation d'ADAMTS13 dans des grossesses témoin (normales et donc non PTTi), qui pourrait être partiellement et physiologiquement ouverte en raison des taux élevés et persistants de VWF, et donc être un facteur participatif clef dans la rupture de tolérance immune du PTTi obstétrical. Si cette hypothèse se vérifie, il est néanmoins clair que le déclenchement d'un PTTi obstétrical est multifactoriel puisque toutes les grossesses ne s'accompagnent évidemment pas d'un PTTi. Un autre facteur qui pourrait théoriquement être impliqué dans le processus de rupture de tolérance immune du PTTi est la présence de mutation du gène *ADAMTS13* conduisant à un changement de conformation de la protéine exposant son site cryptique. La mutation R1060W du gène *ADAMTS13* ayant été retrouvée dans 10% d'une ancienne cohorte de PTTi<sup>352</sup>, nous avons recherché cette mutation particulière dans une cohorte de 98 PTTi du CNR-MAT, afin de documenter sa fréquence et son potentiel rôle pathogène. Finalement, au contraire de Camilleri et al, nous n'avons pas retrouvé cette mutation dans l'ensemble des 98 PTTi étudiés, ce qui est en défaveur d'un rôle de facteur de risque au développement du PTTi. Toutefois, une analyse *a posteriori* des patients présentés dans la publication de Camilleri ainsi que l'expérience récente du CNR-MAT nous conduit à faire une autre lecture de l'association potentielle entre la présence à l'état hétérozygote de la mutation R1060W et l'existence d'un PTTi. En effet, chez de très rares patients PTTi du CNR-MAT, nous avons remarqué que l'activité d'ADAMTS13 plafonnait à 30% en parfaite rémission clinique (données confidentielles du CNR-MAT) et cela après plusieurs lignes d'immunosuppresseurs (rituximab, vincristine, daratumumab...). Par esprit de système, nous avons séquencé le gène *ADAMTS13* de certains de ces patients et avons retrouvé une mutation hétérozygote R1060W dans quelques cas isolés (données non publiées du CNR-MAT) ce qui explique *a priori* pourquoi leur activité d'ADAMTS13 de base ne peut dépasser ~30%. Cette considération a plusieurs implications : un séquençage du gène *ADAMTS13* pourrait être proposé à ces très rares patients PTTi particuliers, en vue de documenter une éventuelle mutation à l'état hétérozygote expliquant la récupération partielle de leur activité d'ADAMTS13 en rémission. Cela permettrait surtout d'adapter voire d'arrêter le traitement immunosuppresseur dont l'escalade est alors inutile, et donc de proposer une prise en charge personnalisée aux patients. Ces patients demeurent exceptionnels si bien que le séquençage d'*ADAMTS13* de patients atteints de PTTi doit rester une prescription d'experts limitée à des situations cliniques précises validées en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) nationale.

Le deuxième groupe de patientes que nous rapportons est une nouvelle entité, **le PTTu obstétrical** (représentant un quart des patientes), dont les caractéristiques biologiques diffèrent du PTTu non obstétrical décrit par Joly et al<sup>207</sup>. Le PTTu obstétrical présente des caractéristiques biologiques particulières à la phase aiguë : activité d'ADAMTS13 effondrée par la méthode FRET-S-VWF73 mais détectable par chimiluminescence, absence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13, antigène d'ADAMTS13 diminué et conformation d'ADAMTS13 ouverte. Ce dernier point surprenant a plusieurs implications. La première hypothèse à évoquer est celle de PTTi mal étiquetés par absence de détection d'auto-anticorps anti-ADAMTS13. En effet, on sait qu'une petite proportion de patients atteints d'authentiques PTTi (10 à 20%) peuvent avoir une recherche négative d'IgG anti-ADAMTS13 à la phase aiguë (par défaut de sensibilité de la technique ELISA utilisée qui ne détecte que les IgG libres et qui est donc incapable de détecter les IgG piégées dans les complexes immuns)<sup>202</sup>. Ce scénario est

probablement correct pour les trois patientes de notre cohorte ayant rechuté, en particulier une pour laquelle les anticorps anti-ADAMTS13 ont pu être mis en évidence à l'occasion d'une rechute. Toutefois, pour les 24 autres patientes, le faible besoin en immunosuppresseurs et surtout l'absence totale de rechute (que ce soit ou non au cours d'une grossesse ultérieure) est en faveur d'un mécanisme non auto-immun. Nous proposons deux hypothèses mécanistiques pour expliquer le déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 à conformation d'ADAMTS13 ouverte dans le PTTu obstétrical. Notre première hypothèse est un mécanisme de dégradation d'ADAMTS13, expliquant la « disponibilité » du site cryptique (au sein d'un fragment d'ADAMTS13 résultant du troncage de sa partie C-terminale par exemple) pour l'anticorps monoclonal utilisé dans le test ELISA « conformation », et ayant pour conséquence un indice de conformation calculé en faveur d'une conformation ouverte. La seconde hypothèse est la prolongation d'un processus physiologique lié aux taux élevés et persistants de VWF conduisant à une ouverture physiologique d'ADAMTS13 et à sa consommation (par un excès de substrat) jusqu'à un déficit quantitatif sévère. Quoi qu'il en soit, la présence d'une conformation ouverte d'ADAMTS13 dans le PTTu ne permet pas d'utiliser ce biomarqueur pour corriger un diagnostic de PTTi dans le cas où la recherche d'IgG anti-ADAMTS13 serait faussement négative. Les discordances observées entre les méthodes de mesure de l'activité d'ADAMTS13 pourraient également être un indice quant au mécanisme du PTTu obstétrical. En effet, il est possible d'imaginer que la méthode chimiluminescente soit plus sensible que la méthode FRET-VWF73 pour détecter et quantifier une activité d'ADAMTS13 résiduelle (comprise entre 10 et 30%) provenant de quantité minimale d'ADAMTS13 intègre ou dégradée.

Le troisième groupe de patientes de notre cohorte correspond au **PTTc de révélation obstétricale** (environ un quart des patientes). Le phénotype biologique est comparable à ce qui a été rapporté : activité d'ADAMTS13 très diminuée (le plus souvent comprise entre 5 et 10 UI/dL par méthode chimiluminescente), absence d'auto-anticorps anti-ADAMTS13, conformation d'ADAMTS13 fermée, mutations délétères du gène *ADAMTS13* avec une fréquence élevée de la mutation R1060W. Les mutations associées au PTTc de révélation obstétricale conduisent vraisemblablement à un déficit quantitatif en ADAMTS13, avec un maintien d'une balance VWF/ADAMTS13 équilibrée en l'absence de stimulus entraînant une augmentation du VWF plasmatique. La persistance de taux élevés de VWF au cours de la grossesse romprait donc cet équilibre précaire et conduirait à un excès considérable de VWF déclenchant une poussée de PTT symptomatique. Cette hypothèse est par ailleurs supportée par la très faible fréquence d'hommes porteurs de la mutation R1060W dans la cohorte globale de PTTc. Ces hommes, statistiquement aussi nombreux que les femmes de génotype identique, ne développent pas de PTT car ils ont une probabilité beaucoup plus faible que les femmes d'être soumis à des situations physiologiques (modèle de la grossesse, prise de contraceptifs oraux) les exposant à des taux aussi élevés et persistants de VWF. Outre cette différence d'expression clinique du PTTc de révélation à l'âge adulte liée au sexe, on constate une grande variabilité inter-individuelle de la sévérité de la symptomatologie du PTTc qui suggère l'existence de facteurs modulateurs. Ainsi, l'hétérogénéité de la distribution des multimères du VWF que nous avons retrouvée chez les patients à la phase aiguë du PTT (qu'il s'agisse de PTT acquis ou de PTTc), malgré l'association apparente d'une perte de multimères de HPM de VWF avec une présentation clinique plus grave (thrombopénie sévère et signes



neurologiques), souligne l'importante variation inter-individuelle existant dans la présentation clinique initiale du PTT au sens large. Pour tenter d'aller plus loin dans l'identification d'éventuels facteurs modulateurs de la symptomatologie du PTTc, la recherche de facteurs de risque constitutionnels touchant des gènes codant pour des protéines (autres qu'ADAMTS13) impliquées dans la physiopathologie du PTT (VWF et glycoprotéines plaquettaires) est un autre axe de recherche novateur de notre travail. Le principal variant d'intérêt identifié est un polymorphisme du gène *VWF* présent chez 100% des patientes explorées, dont 80% à l'état homozygote, tandis que sa fréquence dans la population générale est estimée à 10%. La caractérisation biochimique de ce variant à l'état homozygote révèle une augmentation significative des taux de VWF<sup>369-372</sup>. Cette augmentation du taux basal de VWF, en association avec les mutations délétères d'*ADAMTS13* conduisant le plus souvent à un déficit quantitatif sévère dans le PTTc adulte, pourrait être impliquée dans une formation accrue des microthrombi et *in fine* dans la symptomatologie plus sévère de certains PTTc. Cette question de l'importance du fond génétique conditionnant les taux basaux de VWF plasmatique dans l'expressivité clinique du PTTc a d'ailleurs été clairement démontré dans le modèle murin de PTTc (souris invalidées pour le gène *ADAMTS13*)<sup>382,383</sup>.

Le troisième volet de notre travail est centré sur la **prise en charge thérapeutique du PTT obstétrical, tant à la phase aiguë que pendant le suivi en rémission**. Cet aspect clinique est intimement lié au mécanisme du PTT.

La prise en charge du PTTi obstétrical est globalement similaire à celle du PTTi idiopathique et repose sur l'apport d'ADAMTS13 exogène par EP associé à un traitement immunosuppresseur, avec toutefois plusieurs spécificités liées à la grossesse. L'utilisation du rituximab au cours de la grossesse est idéalement conditionnée par la mise en évidence d'IgG anti-ADAMTS13 contrairement au PTTi idiopathique où le rituximab est plus volontiers instauré de façon probabiliste avant la documentation formelle de la présence des IgG anti-ADAMTS13. Ceci s'explique par la fréquence très élevée du mécanisme auto-immun dans le PTT idiopathique, alors que la forme acquise auto-immune ne concerne que la moitié des patientes atteintes de PTT obstétrical. La réticence à instaurer le rituximab au cours de la grossesse s'explique aussi par la prudence associée au risque malformatif fœtal. Les données sont parcellaires mais globalement rassurantes : l'expérience du Centre de Référence des Agents Tératogènes sur le rituximab au cours de la grossesse (quelle qu'en soit l'indication) ne rapporte aucun élément inquiétant à ce jour<sup>384</sup>. Par analogie avec les IgG natives, il est probable que le passage placentaire du rituximab ne commence qu'à partir de 14 SA, soit un mois après la fin de l'organogénèse (10 SA). Les études sur un modèle animal n'ont pas mis en évidence d'effet tératogène<sup>334</sup>. Des cytopénies néo-natales transitoires, le plus souvent sans expression clinique, sont rapportées, ainsi qu'un risque accru d'infections materno-fœtales<sup>384</sup>. De façon idéale, le traitement par rituximab devrait si possible être instauré après une extraction fœtale et la documentation des IgG anti-ADAMTS13. Le deuxième point de réflexion concerne le traitement par caplacizumab. Au regard de la période d'inclusion des patientes, nous ne rapportons que quatre patientes PTTi traitées par caplacizumab, instauré uniquement après extraction fœtale. Aucune de ces patientes n'a souffert de complication hémorragique, mais une surveillance particulière s'impose compte tenu du risque hémorragique lié à

l'accouchement. Il n'existe qu'une seule patiente atteinte de PTTi obstétrical traitée par caplacizumab dans la littérature<sup>337</sup>, ce qui ne permet évidemment pas de tirer de conclusions. Nous estimons que l'utilisation du caplacizumab au cours de la grossesse doit faire l'objet d'une balance bénéfice-risque discutée entre experts. Parmi les points positifs, le caplacizumab fait aujourd'hui partie intégrante de l'arsenal thérapeutique du PTTi avec un bénéfice clinique certain et un profil d'effets secondaires, notamment hémorragiques, rassurant. Le caplacizumab est un nanocorps humanisé dirigé contre le domaine A1 du VWF empêchant sa liaison à la GPIb plaquettaire et accélérant sa clairance ; le caplacizumab induit donc un phénotype biologique similaire au variant de type 2M de la maladie de Willebrand (VWD) constitutionnelle (VWFRCo < 20%, VWFAg ~100%, distribution subnormale des multimères du VWF sans perte des HPM)<sup>238,251,252</sup> qui reste l'un des variants moléculaires le moins hémorragique. Le passage placentaire du caplacizumab a été démontré mais son effet sur le fœtus n'est pas connu. Néanmoins, les fœtus atteints de VWD de type 2M ne saignant classiquement pas<sup>56</sup>, il est raisonnable d'imaginer que l'éventuel syndrome de Willebrand acquis « VWD 2M-like » fœtal induit par le passage transplacentaire du caplacizumab n'aurait que peu de conséquences hémorragiques sur le fœtus. Aucun effet tératogène ou de toxicité embryo-foetale n'ont été rapportés dans les études réalisées chez l'animal<sup>385</sup>. Toutefois, le manque de données doit évidemment inciter à la précaution. Si le PTT obstétrical survient en fin de grossesse, il paraît plus prudent d'attendre l'extraction fœtale avant d'instaurer le caplacizumab (comme pour le rituximab) ce qui limiterait aussi le sur-risque hémorragique maternel au cours de l'accouchement. En revanche, devant un PTT survenant avant 24 SA, la question de l'initiation du caplacizumab se pose et doit être tranchée au cas par cas, après un avis d'experts en RCP nationale.

Au-delà de la phase aiguë du PTTi obstétrical, le risque de rechute peut survenir indépendamment d'une grossesse ultérieure et motive donc un suivi clinique et biologique au long cours. Le paramètre le plus sensible pour la détection d'une rechute de PTT reste l'activité d'ADAMTS13, dont la fréquence de surveillance peut être adaptée au cas par cas chez les PTT acquis (PTTi et PTTu). La valeur pronostique de la conformation d'ADAMTS13 pour la prédiction précoce d'une rechute reste mal connue, mais la détection d'une conformation ouverte à activité d'ADAMTS13 normale ou modérément réduite constituerait un critère de suivi accru<sup>199,263</sup>. Pour toute grossesse ultérieure, un accompagnement personnalisé est à recommander, permettant notamment d'expliquer à la patiente le risque de rechute de PTT, le risque de complications et l'importance d'un suivi régulier. L'activité d'ADAMTS13 en début de grossesse semble être un paramètre clef du risque de rechute, qui est très accru si elle est diminuée voire effondrée en début de grossesse. Ce concept souligne l'importance de normaliser l'activité d'ADAMTS13 en début de grossesse, notamment par un traitement préemptif par rituximab suivi d'une période d'élimination de 6 à 12 mois avant la conception. Aussi, il faut garder à l'esprit que le suivi de l'activité d'ADAMTS13 peut être d'interprétation difficile chez ces patientes où une diminution de l'activité d'ADAMTS13 peut être soit physiologique soit marquer le début d'une rechute<sup>160,294,338</sup>. A ce titre, il pourrait être intéressant de compléter la mesure de l'activité d'ADAMTS13 par l'étude de sa conformation pour distinguer une diminution physiologique d'une diminution pathologique annonciatrice d'une poussée de PTT. Un risque accru de prééclampsie est rapporté dans la littérature<sup>269</sup>, mais nos

résultats ne nous permettent pas de le confirmer. Toutefois, la prudence nous incite à préconiser une vigilance accrue.

La prise en charge du PTTc obstétrical repose essentiellement sur l'apport d'ADAMTS13 exogène par des EP ou par la perfusion de poches de PFC. Ces patientes se caractérisent par une grande hétérogénéité en termes de besoin en plasma. En l'absence de mécanisme auto-immun, il n'y a pas de rationnel à instaurer un traitement immunosuppresseur. Toutefois, contrairement à la forme idiopathique de PTT qui ne conduit au diagnostic de PTTc que de façon rarissime chez l'adulte, la fréquence élevée des PTT non auto-immuns (PTTc comme PTTu) en contexte obstétrical complique la décision d'instaurer un traitement immunosuppresseur. La disponibilité rapide de la recherche des IgG anti-ADAMTS13 prend tout son sens dans ce contexte urgent. Une recherche d'IgG anti-ADAMTS13 positive objective un PTTi tandis qu'une recherche négative peut être compatible avec un PTTc, un PTTu ou beaucoup plus rarement un PTTi (par défaut de sensibilité de la recherche d'IgG anti-ADAMTS13). Le diagnostic moléculaire n'est malheureusement pas disponible en urgence pour confirmer ou infirmer le diagnostic de PTTc et donc guider l'attitude thérapeutique à la phase aiguë du PTT. Dans ce contexte d'urgence, les immunosuppresseurs (corticoïdes voire rituximab) sont donc parfois instaurés « en excès », sur un argument probabiliste, par crainte de sous-diagnostiquer un PTTi. Il n'existe aucune donnée sur l'utilisation du caplacizumab dans le PTTc obstétrical. Le PTTc révélé à l'âge adulte se distingue des PTTi et PTTu obstétricaux par une conformation d'ADAMTS13 fermée à la phase aiguë<sup>137</sup>, ce qui pourrait être utile pour un diagnostic différentiel plus rapide que le séquençage du gène *ADAMTS13*. Le suivi au long cours des patientes PTTc de notre cohorte est concordant avec ce qui est rapporté dans la littérature<sup>138,155,160,330</sup> : un risque de rechute quasi-nul en l'absence de grossesse contrastant avec un risque de rechute de 100% à l'occasion de grossesses ultérieures. Cette observation motive d'une part une abstention thérapeutique hors contexte obstétrical (pas de nécessité de prophylaxie au long cours au contraire des PTTc à révélation pédiatrique<sup>163</sup>), et d'autre part une plasmathérapie prophylactique en cas de grossesse afin de minimiser le risque de rechute. Ainsi, comme pour le PTTi, un projet de grossesse doit idéalement être extrêmement encadré chez les patientes PTTc. Compte tenu de l'impact important du diagnostic de PTTc (et malgré le caractère autosomique récessif de cette maladie), un conseil génétique pourrait être apporté aux patientes identifiées afin de proposer un séquençage d'*ADAMTS13* de leur conjoint et de déterminer le risque de PTTc dans la descendance.

La question de la prise en charge thérapeutique du PTTu obstétrical est plus difficile à trancher. En l'absence de mécanisme clairement identifié, il est plus difficile de proposer une attitude thérapeutique rationnelle dans le PTTu que dans le PTTi ou le PTTc. Au regard des thérapeutiques instaurées chez les patientes de notre cohorte, il paraît raisonnable de préconiser l'apport d'ADAMTS13 exogène par EP associé à des corticoïdes ; la question du caplacizumab pourra être considérée au cas par cas avec une balance bénéfique / risque vraisemblablement comparable à ce que nous proposons pour le PTTi. En attendant une meilleure compréhension mécanistique menant à une thérapeutique peut-être plus adaptée, ces cas difficiles doivent faire l'objet de discussion d'experts. Notre travail montre que cette forme particulière de PTTu est caractérisée par un risque quasi-nul de rechute, indépendamment d'une

éventuelle grossesse ultérieure. Toutefois, la méconnaissance physiopathologique doit inciter à la prudence et une surveillance clinico-biologique régulière est souhaitable.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le PTT obstétrical est une entité particulière, tant au sein de l'ensemble des PTT que dans le spectre des MAT obstétricales. Ce travail de recherche clinique translationnelle, reprenant vingt ans d'expérience du CNR-MAT, permet d'apporter des réponses à plusieurs questions diagnostiques, physiopathologiques et thérapeutiques.

Le diagnostic de PTT obstétrical reste une difficulté majeure, et notre étude alerte sur le risque d'exclusion à tort du diagnostic de PTT, sur la base de certains marqueurs. En effet, un ratio sFIt-1/PIGF élevé et une activité d'ADAMTS13 détectable par chimiluminescence ne suffisent pas à exclure formellement un diagnostic de PTT. Néanmoins, l'urgence thérapeutique inhérente au PTT obstétrical nécessiterait idéalement une confirmation biologique par mesure de l'activité d'ADAMTS13 avec la méthode de référence FRETs-VWF73, ce qui demeure impossible aujourd'hui. Ainsi, une première perspective d'intérêt serait le développement d'un score de probabilité clinique et biologique dédié au PTT en contexte obstétrical. Ce score devrait être réalisable à partir de paramètres cliniques et biologiques disponibles en urgence (pression artérielle, numération formule sanguine, ionogramme ...) et avoir la meilleure valeur prédictive négative possible, c'est-à-dire permettre en premier lieu un diagnostic d'exclusion de PTT. Secondairement, la disponibilité d'un TROD permettant le dépistage d'un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 aurait un bénéfice certain dans les PTT non idiopathiques où des facteurs confondants, en l'occurrence le contexte obstétrical, compliquent le diagnostic et l'instauration probabiliste d'EP. Les caractéristiques techniques et diagnostiques du TROD que nous avons évalué sont insuffisantes. Ainsi, le développement, en partenariat avec les industriels du diagnostic *in vitro*, d'un TROD plus performant est une perspective d'intérêt. La mesure de l'activité d'ADAMTS13 par méthode chimiluminescence est déjà bien implantée dans un certain nombre de laboratoire d'hémostase de CHU en France. La recommandation du laboratoire ADAMTS13 du CNR-MAT reste de mesurer l'activité d'ADAMTS13 par méthode de référence FRETs-VWF73 en première intention, mais dans le cas général du PTT idiopathique, la méthode chimiluminescente reste une excellente alternative. Néanmoins, l'identification de discordances diagnostiques, en particulier dans le spectre des PTT obstétricaux, constitue un point d'alerte qui doit être communiqué aux biologistes qui auraient adopté la méthode chimiluminescente de manière exclusive. Un contrôle de la mesure de l'activité d'ADAMTS13 par la méthode de référence FRETs-VWF73 est indispensable en cas de doute diagnostique. A cet égard, une discussion sur la place et le bon usage de la méthode chimiluminescente au sein de les méthodes d'exploration d'ADAMTS13 serait à recommander.

Un aspect phare de notre travail est l'étude approfondie des mécanismes physiopathologiques responsables du PTT obstétrical, notamment grâce à l'étude de la conformation d'ADAMTS13. Le PTTi obstétrical est, comme le PTTi idiopathique, caractérisé par une conformation d'ADAMTS13 ouverte qui pourrait être à l'origine de la rupture de tolérance immune. Au cours du suivi de ces patientes, et en particulier à l'occasion de grossesses ultérieures, le suivi de la conformation d'ADAMTS13 en parallèle de l'activité d'ADAMTS13 pourrait être informatif et constituer un biomarqueur précoce de rechute. Notre travail décrit pour la première fois l'entité PTTu obstétricale, qui diffère des PTTu non obstétricaux par

la présence d'une conformation d'ADAMTS13 ouverte malgré, a priori, l'absence d'autoanticorps anti-ADAMTS13. Le PTTu mérite bien entendu de faire l'objet d'études supplémentaires dédiées à l'élucidation de ses mécanismes physiopathologiques. Ainsi, l'étude des produits de dégradation d'ADAMTS13 par Western Blot serait une première étape permettant d'étayer l'hypothèse de dégradation d'ADAMTS13. De façon plus générale, ce travail met en lumière le flou existant autour des PTTu, tant en termes de diagnostic que de prise en charge, ce qui pourrait constituer une nouvelle étude du registre français du CNR-MAT.

Nous nous sommes intéressés à l'existence de facteurs de risque constitutionnels au développement de PTTi, en ciblant notre étude sur la recherche de la mutation R1060W. Si notre travail n'a pas permis de détecter de patients PTTi porteurs de cette mutation, l'identification de très rares patients PTTi du CNR-MAT présentant une mutation délétère d'ADAMTS13 à l'état hétérozygote doit inciter à la réflexion. Le séquençage du gène ADAMTS13 pourrait dorénavant être proposé aux PTTi ne normalisant pas leur activité d'ADAMTS13 après plusieurs lignes de traitement immunosuppresseurs. Ce diagnostic de précision permettrait une thérapeutique personnalisée pour les rares patients concernés. Nous avons également recherché des facteurs constitutionnels (hors gène ADAMTS13) pouvant expliquer la variabilité inter-individuelle d'expression clinique chez les patients atteints de PTT. En première approche, nous avons choisi de focaliser notre étude sur les patientes PTTc obstétricaux dont la relative homogénéité génétique permet plus une comparaison plus aisée. A ce stade, nous avons identifié un variant du gène VWF qui pourrait intervenir dans la physiopathologie du PTT. Cette étude doit être poursuivie, en élargissant les patients inclus aux PTTc pédiatriques et aux PTT acquis, avec comme principaux critères de comparaison, la présentation clinico-biologique, la réponse au traitement (notamment caplacizumab) et le taux de rechutes.

Le PTT est une pathologie dont la compréhension des mécanismes physiopathologiques a considérablement facilité l'essor de nouvelles thérapies. Le caplacizumab fait aujourd'hui partie intégrante de l'arsenal thérapeutique du PTTi idiopathique. Le contexte obstétrical constituait un critère d'exclusion dans les essais cliniques sur la caplacizumab, et son autorisation de mise sur le marché relativement récente explique le manque de données disponibles dans le PTT obstétrical. Le bénéfice du caplacizumab en termes de réduction de la durée de normalisation plaquettaire et de réduction des exacerbations est contrebalancé par le surrisque hémorragique maternel et le passage transplacentaire avec des conséquences inconnues chez le fœtus. Un observatoire colligeant les observations de PTT obstétricaux traités par caplacizumab (par accès compassionnel sur demande du prescripteur pour le moment, motivé par exemple par une forme très sévère de PTT obstétrical) serait à cet égard très intéressant à proposer sous l'égide du CNR-MAT. Aussi, la disponibilité d'une rhADAMTS13 (ADAMTS13 recombinante humaine) pourrait également révolutionner la prise en charge du PTT en général et du PTT obstétrical en particulier. Le contexte obstétrical constitue une fois de plus un critère d'exclusion des premiers essais cliniques sur la rhADAMTS13, mais cette molécule pourrait théoriquement remplacer les EP utilisés en traitement curatif à la phase aiguë du PTT. De façon plus ciblée, la plasmathérapie prophylactique proposée aux patientes PTTc pour encadrer leur projet de grossesse pourrait également être remplacée par des injections prophylactiques de rhADAMTS13, de façon comparable à ce qui est déjà réalisé avec d'autres protéines recombinantes (VWF, insuline...)

pour d'autres pathologies (VWD, diabète...). Ces évolutions thérapeutiques doivent bien entendu être décidées après évaluation de la balance bénéfico-risque et faire l'objet d'une étude prospective de non-infériorité, vraisemblablement sur un modèle multicentrique international compte tenu de la rareté de la pathologie.

Une question ancillaire soulevée par notre travail est l'évaluation du risque de rechute à l'occasion d'une grossesse chez les patientes ayant un antécédent de PTTi idiopathique (de facto non obstétrical). Par analogie avec les grossesses ultérieures des PTTi de notre cohorte, il y a tout lieu de penser que ces projets de grossesse à risque de rechute de PTT devraient être encadrés, avec notamment un suivi biologique centré sur l'activité d'ADAMTS13. Une étude rétrospective des données de suivi des femmes en âge de procréer atteintes de PTTi idiopathique du registre du CNR-MAT constituerait ainsi une intéressante perspective de travail complémentaire de cette thèse.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Von Willebrand EA. Hereditar pseudoheemophili. *Fin Lakaresällsk Handl.* 1926;68:87–112.
2. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.* 1971;50(1):244–254.
3. Legaz ME, Schmer G, Counts RB, Davie EW. Isolation and characterization of human Factor VIII (antihemophilic factor). *J. Biol. Chem.* 1973;248(11):3946–3955.
4. Gralnick H, Coller B. Studies of the human factor VIII/von Willebrand's factor protein. II. Identification and characterization of the von Willebrand protein. *Blood.* 1975;46(3):417–430.
5. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, et al. Human von Willebrand Factor (vWF): Isolation of Complementary DNA (cDNA) Clones and Chromosomal Localization. *Science (80- ).* 1985;228(4706):1401–1406.
6. Lynch DC, Zimmerman TS, Collins CJ, et al. Molecular cloning of cDNA for human von willebrand factor: Authentication by a new method. *Cell.* 1985;41(1):49–56.
7. Verweij CL, de Vries CJ m., Distel B, et al. Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene. *Nucleic Acids Res.* 1985;13(13):4699–4717.
8. Sadler JE, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, et al. Cloning and characterization of two cDNAs coding for human von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985;82(19):6394–6398.
9. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1989;264(33):19514–19527.
10. Titani K, Kumar S, Takio K, et al. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry.* 1986;25(11):3171–3184.
11. Wagner DD, Marder VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells. Identification of a large precursor polypeptide chain. *J. Biol. Chem.* 1983;258(4):2065–2067.
12. Sporn LA, Chavin SI, Marder VJ, Wagner DD. Biosynthesis of von Willebrand protein by human megakaryocytes. *J. Clin. Invest.* 1985;76(3):1102–1106.
13. Hoyer L, Shainoff J. Factor VIII-related protein circulates in normal human plasma as high molecular weight multimers. *Blood.* 1980;55(6):1056–1059.
14. Counts RB, Paskell SL, Elgee SK. Disulfide Bonds and the Quaternary Structure of Factor VIII/von Willebrand Factor. *J. Clin. Invest.* 1978;62(3):702–709.
15. Zhou Y-F, Eng ET, Zhu J, et al. Sequence and structure relationships within von Willebrand

- factor. *Blood*. 2012;120(2):449–458.
16. Lenting PJ, Christophe OD, Denis C V. von Willebrand factor biosynthesis , secretion , and clearance : connecting the far ends. *Blood*. 2015;125(13):2019–2028.
  17. Mayadas TN, Wagner DD. In vitro multimerization of von Willebrand factor is triggered by low pH. Importance of the propolypeptide and free sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* 1989;264(23):13497–13503.
  18. Katsumi A, Tuley EA, Bodó I, Sadler JE. Localization of Disulfide Bonds in the Cystine Knot Domain of Human von Willebrand Factor. *J. Biol. Chem.* 2000;275(33):25585–25594.
  19. Canis K, McKinnon TAJ, Nowak A, et al. Mapping the N-glycome of human von Willebrand factor. *Biochem. J.* 2012;447(2):217–228.
  20. Wagner DD, Mayadas T, Marder VJ. Initial glycosylation and acidic pH in the Golgi apparatus are required for multimerization of von Willebrand factor. *J. Cell Biol.* 1986;102(4):1320–1324.
  21. Lenting PJ, Westein E, Terraube V, et al. An Experimental Model to Study the in Vivo Survival of von Willebrand Factor. *J. Biol. Chem.* 2004;279(13):12102–12109.
  22. Zeng J, Shu Z, Liang Q, et al. Structural basis of von Willebrand factor multimerization and tubular storage. *Blood*. 2022;139(22):3314–3324.
  23. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem.* 1998;67:395–424.
  24. Samor B, Michalski J-C, Mazurier C, et al. Primary structure of the major O-glycosidically linked carbohydrate unit of human von Willebrand factor. *Glycoconj. J.* 1989;6(3):263–270.
  25. Kano T, Kondo K, Hamako J, et al. Effects of plasma glycosyltransferase on the ABO(H) blood group antigens of human von Willebrand factor. *Int. J. Hematol.* 2018;108(2):139–144.
  26. CANIS K, MCKINNON TAJ, NOWAK A, et al. The plasma von Willebrand factor O -glycome comprises a surprising variety of structures including ABH antigens and disialosyl motifs. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(1):137–145.
  27. McGrath RT, van den Biggelaar M, Byrne B, et al. Altered glycosylation of platelet-derived von Willebrand factor confers resistance to ADAMTS13 proteolysis. *Blood*. 2013;122(25):4107–4110.
  28. Wagner DD. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1982;95(1):355–360.
  29. Vischer U, Wagner D. von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies. *Blood*. 1994;83(12):3536–3544.
  30. Schillemans M, Karampini E, Kat M, Bierings R. Exocytosis of Weibel–Palade bodies: how to

- unpack a vascular emergency kit. *J. Thromb. Haemost.* 2019;17(1):6–18.
31. Denis C, Methia N, Frenette PS, et al. A mouse model of severe von Willebrand disease: Defects in hemostasis and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998;95(16):9524–9529.
  32. Haberichter SL, Merricks EP, Fahs SA, et al. Re-establishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells. *Blood.* 2005;105(1):145–152.
  33. Schillemans M, Kat M, Westeneng J, et al. Alternative trafficking of Weibel-Palade body proteins in CRISPR/Cas9-engineered von Willebrand factor-deficient blood outgrowth endothelial cells. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2019;3(4):718–732.
  34. Valentijn KM, Valentijn JA, Jansen KA, Koster AJ. A new look at Weibel-Palade body structure in endothelial cells using electron tomography. *J. Struct. Biol.* 2008;161(3):447–458.
  35. van Breevoort D, Sniijders AP, Hellen N, et al. STXBP1 promotes Weibel-Palade body exocytosis through its interaction with the Rab27A effector Slp4-a. *Blood.* 2014;123(20):3185–3194.
  36. Zhu Q, Yamakuchi M, Lowenstein CJ. SNAP23 Regulates Endothelial Exocytosis of von Willebrand Factor. *PLoS One.* 2015;10(8):e0118737.
  37. Schillemans M, Karampini E, van den Eshof BL, et al. Weibel-Palade Body Localized Syntaxin-3 Modulates Von Willebrand Factor Secretion From Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018;38(7):1549–1561.
  38. Kat M, Karampini E, Hoogendijk AJ, et al. Syntaxin 5 determines Weibel-Palade body size and Von Willebrand factor secretion by controlling Golgi architecture. *Haematologica.* 2022;107(8):1827–1839.
  39. Yadegari H, Biswas A, Ahmed S, Naz A, Oldenburg J. von Willebrand factor propeptide missense variants affect anterograde transport to Golgi resulting in ER retention. *Hum. Mutat.* 2021;42(6):731–744.
  40. Bowman M, Casey L, Selvam S, et al. von Willebrand factor propeptide variants lead to impaired storage and ER retention in patient-derived endothelial colony-forming cells. *J Thromb Haemost.* 2022;20(7):1599–1609.
  41. Schillemans M, Karampini E, van den Eshof B, et al. The Weibel-Palade Body Localized SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor) Syntaxin-3 Modulates Von Willebrand Factor Secretion From Endothelial Cells. *Arter. Thromb Vasc Biol.* 2018;38(7):1549–1561.
  42. Jiang Z, Zhu J, Zhao C, et al. Shear stress regulates the SNAP23-mediated endothelial secretion of VWF through the GPR68/PKA/vimentin mechanotransduction pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022;607:166–173.
  43. Lancellotti S, Sacco M, Basso M, Cristofaro R De. Mechanochemistry of von Willebrand factor. *Biomol. Concepts.* 2019;10(1):194–208.

44. Slayter H, Loscalzo J, Bockenstedt P, Handin RI. Native conformation of human von Willebrand protein. Analysis by electron microscopy and quasi-elastic light scattering. *J. Biol. Chem.* 1985;260(14):8559–8563.
45. Parker ET, Lollar P. Conformation of the von Willebrand factor/factor VIII complex in quasi-static flow. *J. Biol. Chem.* 2021;296:100420.
46. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant K, et al. Shear-Dependent Changes in the Three-Dimensional Structure of Human von Willebrand Factor. *Blood.* 1996;88(8):2939–2950.
47. Springer TA. Von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood.* 2014;124(9):1412–1425.
48. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of Platelet Adhesion by Arrest onto Fibrinogen or Translocation on von Willebrand Factor. *Cell.* 1996;84(2):289–297.
49. 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;108(28):11602–11607.
50. Lynch CJ, Lane DA, Luken BM. Control of VWF A2 domain stability and ADAMTS13 access to the scissile bond of full-length VWF. *Blood.* 2014;123(16):2585–2592.
51. 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):4223–34.
52. Englender T, Lattuada A, Mannucci P, Sadler J, Inbal A. Analysis of Arg834Gln and Val902Glu type 2A von Willebrand disease mutations: studies with recombinant von Willebrand factor and correlation with patient characteristics. *Blood.* 1996;87(7):2788–2794.
53. Hassenpflug WA, Budde U, Obser T, et al. Impact of mutations in the von Willebrand factor A2 domain on ADAMTS13-dependent proteolysis. *Blood.* 2006;107(6):2339–2345.
54. Lankhof HL, van Hoeij M, Schiphorst ME, et al. A3 Domain Is Essential for Interaction of von Willebrand Factor with Collagen Type III. *Thromb. Haemost.* 1996;75(06):950–958.
55. Posch S, Obser T, König G, et al. Interaction of von Willebrand factor domains with collagen investigated by single molecule force spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 2018;148(12):123310.
56. Leebeek FWG, Eikenboom JCJ. Von Willebrand's Disease. *N. Engl. J. Med.* 2016;375(21):2067–2080.
57. Foster PA, Fulcher CA, Marti T, Titani K, Zimmerman TS. A factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of Von Willerband Factor. *J. Biol. Chem.* 1987;262(18):8443–8446.
58. Takahashi Y, Kalafatis M, Girma J, et al. Localization of a factor VIII binding domain on a 34

- kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. *Blood*. 1987;70(5):1679–1682.
59. Koedam JA, Meijers JCM, Sixma JJ, Bouma BN. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 1988;82(4):1236–1243.
  60. Rastegarlar G, Pegon JN, Casari C, et al. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood*. 2012;119(9):2126–2134.
  61. Ward SE, O’Sullivan JM, Drakeford C, et al. A novel role for the macrophage galactose-type lectin receptor in mediating von Willebrand factor clearance. *Blood*. 2018;131(8):911–916.
  62. Wohner N, Muczynski V, Mohamadi A, et al. Macrophage scavenger receptor SR-AI contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Haematologica*. 2018;103(4):728–737.
  63. Fazavana J, Brophy TM, Chion A, et al. Investigating the clearance of VWF A-domains using site-directed PEGylation and novel N-linked glycosylation. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(6):1278–1290.
  64. Sacco M, Lancellotti S, Branchini A, et al. The p. <sc>P1127S</sc> pathogenic variant lowers von Willebrand factor levels through higher affinity for the macrophagic scavenger receptor <sc>LRP1</sc>: Clinical phenotype and pathogenic mechanisms. *J. Thromb. Haemost.* 2022;20(8):1818–1829.
  65. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, et al. Unusually large plasma Factor VIII:Von Willebrand Factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 1982;307(23):1432–1435.
  66. 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.
  67. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001;413:488–494.
  68. Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand Factor-cleaving Protease (ADAMTS13), a Metalloprotease Involved in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *J. Biol. Chem.* 2001;276(44):41059–41063.
  69. 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;98(6):1662–1666.
  70. Soejima K, Mimura N, Hirashima M, et al. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? *J. Biochem.* 2001;130(4):475–480.

71. Gerritsen HE, Robles R, Lämmle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*. 2001;98(6):1654–1661.
72. Plaimauer B, Zimmermann K, Völkel D, et al. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood*. 2002;100(10):3626–3632.
73. Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, et al. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene*. 2002;283(1–2):49–62.
74. Zhou W, Inada M, Lee TP, et al. ADAMTS13 is expressed in hepatic stellate cells. *Lab. Investig.* 2005;85(6):780–788.
75. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, et al. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. *Blood*. 2005;106(3):922–924.
76. Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF, Moake J. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J. Thromb. Haemost.* 2006;4(6):1396–1404.
77. Liu L, Choi H, Bernardo A, et al. Platelet-derived VWF-cleaving metalloprotease ADAMTS-13. *J. Thromb. Haemost.* 2005;3(11):2536–2544.
78. Manea M, Kristoffersson A, Schneppenheim R, et al. Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 2007;138(5):651–662.
79. Manea M, Tati R, Karlsson J, Békássy ZD, Karpman D. Biologically active ADAMTS13 is expressed in renal tubular epithelial cells. *Pediatr. Nephrol.* 2010;25(1):87–96.
80. Xiao J, Feng Y, Li X, et al. Expression of ADAMTS13 in Normal and Abnormal Placentae and Its Potential Role in Angiogenesis and Placenta Development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017;37(9):1748–1756.
81. 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.
82. 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;81(1):8–13.
83. Crawley JTB, Lam JK, Rance JB, et al. Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood*. 2005;105(3):1085–1093.
84. Zheng X. Structure-function and regulation of ADAMTS13. *J Thromb Haemost.* 2013;14(4):384–399.
85. Lu RN, Yang S, Wu HM, Zheng XL. Unconjugated bilirubin inhibits proteolytic cleavage of von

- Willebrand factor by ADAMTS13 protease. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(6):1064–1072.
86. Sánchez-Luceros A, Fariás C, Amaral M, et al. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb. Haemost.* 2004;92(12):1320–1326.
  87. Terrell DR, Motto DG, Kremer Hovinga JA, et al. Blood group O and black race are independent risk factors for thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe ADAMTS13 deficiency. *Transfusion.* 2011;51(10):2237–2243.
  88. Majerus EM, Zheng X, Tuley EA, Sadler JE. Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *J. Biol. Chem.* 2003;278(47):46643–46648.
  89. Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 2015;16(1):113.
  90. Zhong S, Khalil RA. A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with Thrombospondin Motifs (ADAMTS) Family in Vascular Biology and Disease. *Biochem. Pharmacol.* 2019;164:188.
  91. Zheng XL. Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease. *J. Thromb. Haemost.* 2013;11 Suppl 1(0 1):11–23.
  92. Petri A, Kim HJ, Xu Y, et al. Crystal structure and substrate-induced activation of ADAMTS13. *Nat. Commun.* 2019;10(1):3781.
  93. Kim HJ, Xu Y, Petri A, et al. Crystal structure of ADAMTS13 CUB domains reveals their role in global latency. *Sci. Adv.* 2021;7(16):eabg4403.
  94. 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;106(46):19274–19279.
  95. 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;118(12):3212–3221.
  96. Anderson PJ, Kokame K, Sadler JE. Zinc and calcium ions cooperatively modulate ADAMTS13 activity. *J. Biol. Chem.* 2006;281(2):850–857.
  97. 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.
  98. Muia J, Zhu J, Greco SC, et al. Phylogenetic and functional analysis of ADAMTS13 identifies highly conserved domains essential for allosteric regulation. *Blood.* 2019;133(17):1899–1908.
  99. Ercig B, Arfman T, Hrdinova J, et al. Conformational plasticity of ADAMTS13 in hemostasis and autoimmunity. *J. Biol. Chem.* 2021;297(4):101132.



100. South K, Luken BM, Crawley JTB, et al. Conformational activation of ADAMTS13. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(52):18578–18583.
101. South K, Freitas MO, Lane DA. A model for the conformational activation of the structurally quiescent metalloprotease ADAMTS13 by von willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 2017;292(14):5760–5769.
102. Jian C, Xiao J, Gong L, et al. Gain-of-function ADAMTS13 variants that are resistant to autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2012;119(16):3836–3843.
103. Xiao J, Jin SY, Xue J, et al. 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;31(10):2261–2269.
104. 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.
105. Yang J, Wu Z, Xie X, et al. Characterization of the interactions of ADAMTS13 CUB1 domain to WT- and GOF-Spacer domain by molecular dynamics simulation. *J. Mol. Graph. Model.* 2021;109:108029.
106. Wu Z, Yang J, Xie X, et al. Residues R1075, D1090, R1095, and C1130 Are Critical in ADAMTS13 TSP8-Spacer Interaction Predicted by Molecular Dynamics Simulation. *Molecules.* 2021;26(24):7525.
107. del Amo-Maestro L, Sagar A, Pompach P, et al. An Integrative Structural Biology Analysis of Von Willebrand Factor Binding and Processing by ADAMTS-13 in Solution. *J. Mol. Biol.* 2021;433(13):166954.
108. Moschowitz E. Hyaline thrombosis of terminal arterioles and capillaries : a hitherto undescribed disease. *Proc New York Pathol Soc.* 1924;24:21–24.
109. Singer K, Bornstein FP, Wile SA. Thrombotic thrombocytopenic purpura; hemorrhagic diathesis with generalized platelet thromboses. *Blood.* 1947;2(6):542–554.
110. AMOROSI EL, ULTMANN JE. THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA. *Medicine (Baltimore).* 1966;45(2):139–160.
111. 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;16:943–957.
112. Upshaw JD. Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N. Engl. J. Med.* 1978;298(24):1350–1352.

113. Bukowski RMR, King JWJ, Hewlett JSJ. Plasmapheresis in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1977;50(3):413–417.
114. Gandolfo GM, Afeltra A, Ferri GM. Plasmapheresis for thrombocytopenia. *Lancet*. 1978;1(8073):1095.
115. Okuno T, Kosova L. Plasmapheresis for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP). *Transfusion*. 1979;19(3):342–344.
116. 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;38(5):469–479.
117. Furlan M, Rubles R, Solenthaler M, et al. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1997;89(9):3097–3103.
118. 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(6):1765–1772.
119. Blanchi V, Robles R, Alberio L, Furlan M, Lämmle B. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2002;100(2):710–713.
120. Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. Von Willebrand Factor-Cleaving Protease in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *N. Engl. J. Med*. 1998;339(22):1578–1584.
121. Tsai H-M, Lian EC. Antibodies to Von Willebrand Factor-Cleaving protease in acute TTP. *N. Engl. J. Med*. 1998;339(22):1585–1594.
122. George JN, Vesely SK, Terrell DR. The Oklahoma Thrombotic Thrombocytopenic Purpura-Hemolytic Uremic Syndrome (TTP-HUS) Registry: A Community Perspective of Patients with Clinically Diagnosed TTP-HUS. *Semin. Hematol*. 2004;41(1):60–67.
123. Scully M, Yarranton H, Liesner R, et al. Regional UK TTP Registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. *Br. J. Haematol*. 2008;142(5):819–826.
124. Coppo P, Schwarzinger M, Buffet M, 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.
125. Fujimura Y, Matsumoto M. Registry of 919 Patients with Thrombotic Microangiopathies across Japan: Database of Nara Medical University during 1998-2008. *Intern. Med*. 2010;49(1):7–15.
126. Blombery P, Kivivali L, Pepperell D, et al. Diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) in Australia: findings from the first 5 years of the Australian

- TTP/thrombotic microangiopathy registry. *Intern. Med. J.* 2016;46(1):71–79.
127. Mancini I, Pontiggia S, Palla R, et al. Clinical and Laboratory Features of Patients with Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: Fourteen Years of the Milan TTP Registry. *Thromb. Haemost.* 2019;119(5):695–704.
  128. Pascual-Izquierdo C, del Rio-Garma J, de la Rubia J, et al. Incidence, diagnosis, and outcome of immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura: A nationwide survey by the Spanish registry of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Clin. Apher.* 2021;36(4):563–573.
  129. George JN, Nester CM. Syndromes of Thrombotic Microangiopathy. *N. Engl. J. Med.* 2014;371(7):654–666.
  130. Scully M, Cataland S, Coppo P, et al. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *J. Thromb. Haemost.* 2017;15(2):312–322.
  131. Mariotte E, Azoulay E, Galicier L, et al. Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol.* 2016;3(5):237–245.
  132. Reese JA, Muthurajah DS, Hovinga JAK, et al. Children and adults with thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe, acquired Adamts13 deficiency: Comparison of incidence, demographic and clinical features. *Pediatr. Blood Cancer.* 2013;60(10):1676–1682.
  133. Zhao T, Fan S, Sun L. The global carrier frequency and genetic prevalence of Upshaw-Schulman syndrome. *BMC Genomic Data.* 2021;22(1):50.
  134. Fakhouri F, Zuber J, Frémeaux-Bacchi V, Loirat C. Haemolytic uraemic syndrome. *Lancet (London, England).* 2017;390(10095):681–696.
  135. Yan K, Desai K, Gullapalli L, Druyts E, Balijepalli C. Epidemiology of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Systematic Literature Review. *Clin. Epidemiol.* 2020;12:295–305.
  136. Peyvandi F, Lavoretano S, Palla R, et al. ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission. *Haematologica.* 2008;93(2):232–239.
  137. Joly BS, Boisseau P, Roose E, et al. ADAMTS13 Gene Mutations Influence ADAMTS13 Conformation and Disease Age-Onset in the French Cohort of Upshaw-Schulman Syndrome. *Thromb. Haemost.* 2018;118(11):1902–1917.
  138. Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M, et al. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2012;119(24):5888–5897.
  139. Camilleri RS, Cohen H, Mackie IJ, 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.
140. Beauvais D, Venditti L, Chassin O, et al. Inherited Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Revealed by Recurrent Strokes in a Male Adult: Case Report and Literature Review. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2019;28(6):1537–1539.
  141. Elbaz C, Sholzberg M, Hanif H, Bonnefoy A, Pavenski K. New mutation found to cause hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient presenting with seizures in adulthood. *Platelets.* 2020;31(8):1094–1096.
  142. Sadler JE. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;130(10):1181–1188.
  143. Veyradier A, Lavergne JM, Ribba AS, et al. Ten candidate ADAMTS13 mutations in six French families with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome). *J. Thromb. Haemost.* 2004;2(3):424–429.
  144. Lotta LA, Garagiola I, Palla R, Cairo A, Peyvandi F. ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum. Mutat.* 2010;31(1):11–19.
  145. Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, et al. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J. Thromb. Haemost.* 2011;9(1 S):283–301.
  146. Van Dorland HA, Taleghani MM, Sakai K, et al. The International Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Registry: Key findings at enrollment until 2017. *Haematologica.* 2019;104(10):2107–2115.
  147. Alwan F, Vendramin C, Liesner R, et al. Characterization and treatment of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2019;133(15):1644–1651.
  148. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, 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;99(18):11902–11907.
  149. Plaimauer B, Fuhrmann J, Mohr G, et al. Modulation of ADAMTS13 secretion and specific activity by a combination of common amino acid polymorphisms and a missense mutation. *Blood.* 2006;107(1):118–125.
  150. Akiyama M, Kokame K, Miyata T. ADAMTS13 P475S polymorphism causes a lowered enzymatic activity and urea lability in vitro. *J. Thromb. Haemost.* 2008;6(10):1830–1832.
  151. Schneppenheim R, Kremer Hovinga JA, Becker T, et al. A common origin of the 4143insA ADAMTS13 mutation. *Thromb. Haemost.* 2006;96(1):3–6.
  152. von Krogh AS, Quist-Paulsen P, Waage A, et al. High prevalence of hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura in central Norway: from clinical observation to evidence. *J. Thromb.*

- Haemost.* 2016;14(1):73–82.
153. Kremer Hovinga JA, Heeb SR, Skowronska M, Schaller M. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *J. Thromb. Haemost.* 2018;16(4):618–629.
  154. Miyata T, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y. ADAMTS13 activity and genetic mutations in Japan. *Hamostaseologie.* 2013;33(2):131–137.
  155. Scully M, Thomas M, Underwood M, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy: Presentation, management, and subsequent pregnancy outcomes. *Blood.* 2014;124(2):211–219.
  156. El Sissy MH, El Hafez AA, El Sissy AH. Low incidence of ADAMTS13 missense mutation R1060W in adult egyptian patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol.* 2014;132(1):30–35.
  157. Falter T, Kremer Hovinga JA, Lackner K, et al. Late onset and pregnancy-induced congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie.* 2014;34(3):244–248.
  158. Pikovsky O, Arafat M, Ovadia H, et al. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in a large cohort of patients carrying a novel mutation in ADAMTS13 gene. *Thromb. Res.* 2020;185:167–170.
  159. Xu J, Yu S, Zhang F. Frequent recurrence of pregnancy-triggered congenital thrombotic thrombocytopenic purpura: A rare case report. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2021;77(2):195–200.
  160. Ferrari B, Peyvandi F. How I treat thrombotic thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Blood.* 2020;136(19):2125–2132.
  161. Delmas Y, Helou S, Chabanier P, et al. Incidence of obstetrical thrombotic thrombocytopenic purpura in a retrospective study within thrombocytopenic pregnant women. A difficult diagnosis and a treatable disease. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2015;15(1):137.
  162. Kremer Hovinga JA, Coppo P, Lämmle B, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2017;3:17020.
  163. Joly BS, Stepanian A, Leblanc T, et al. Child-onset and adolescent-onset acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with severe ADAMTS13 deficiency: a cohort study of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol.* 2016;3026(16):1–10.
  164. Louw S, Jacobson BF, Wiggill TM, Chapanduka Z, Sarah Mayne E. HIV-associated thrombotic thrombocytopenic purpura (HIV-TTP): A practical guide and review of the literature. *HIV Med.* 2022;00:1–8.
  165. Wang X, Zhang S, Li L, et al. Ticagrelor-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(26):e11206.

166. Saluja P, Gautam N, Yadala S, Venkata AN. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) after COVID-19 vaccination: A systematic review of reported cases. *Thromb. Res.* 2022;214:115–121.
167. Picod A, Rebibou JM, Dossier A, et al. Immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura following COVID-19 vaccination. *Blood.* 2022;139(16):2565–2569.
168. Weitz IC. Thrombotic microangiopathy in cancer. *Thromb. Res.* 2018;164:S103–S105.
169. Basu MK, Massicano F, Yu L, et al. Exome Sequencing Identifies Abnormalities in Glycosylation and ANKRD36C in Patients with Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Thromb. Haemost.* 2021;121(4):506–517.
170. 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;91(8):2839–2846.
171. Scheiflinger F, Knöbl P, Trattner B, et al. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2003;102(9):3241–3243.
172. Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, et al. Prognostic value of anti-ADAMTS13 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 ADAMTS13 activity. *Blood.* 2007;109(7):2815–2822.
173. Peyvandi F, Ferrari S, Lavoretano S, Canciani MT, Mannucci PM. Von Willebrand factor cleaving (ADAMTS-13) and ADAMTS-13 neutralizing autoantibodies in 100 patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 2004;127(4):433–439.
174. Tsai HM. Deficiency of ADAMTS13 causes thrombotic thrombocytopenic purpura. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23(3):388–396.
175. Rieger M, Mannucci PM, Kremer Hovinga JA, et al. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. *Blood.* 2005;106(4):1262–1267.
176. Tsai HM, Raoufi M, Zhou W, et al. ADAMTS13-binding IgG are present in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* 2006;95(5):886–892.
177. Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, et al. IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2009;7(10):1703–1710.
178. Sinkovits G, Szilágyi Á, Farkas P, et al. Concentration and Subclass Distribution of Anti-ADAMTS13 IgG Autoantibodies in Different Stages of Acquired Idiopathic Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Front. Immunol.* 2018;9:1646.

179. Bettoni G, Palla R, Valsecchi C, et al. ADAMTS-13 activity and autoantibodies classes and subclasses as prognostic predictors in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10(8):1556–1565.
180. 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.
181. 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.* 2010;8(4):856–859.
182. Mancini I, Giacomini E, Pontiggia S, et al. The HLA Variant rs6903608 Is Associated with Disease Onset and Relapse of Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Caucasians. *J. Clin. Med.* 2020;9(10):1–13.
183. 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):3502–10.
184. Verbij FC, Turksma AW, De Heij F, et al. CD4+ T cells from patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura recognize CUB2 domain-derived peptides. *Blood.* 2016;127(12):1606–1609.
185. Gilardin L, Delignat S, Peyron I, et al. The ADAMTS13 1239-1253 peptide is a dominant HLA-DR1-restricted CD4 + T-cell epitope. *Haematologica.* 2017;102(11):1833–1841.
186. 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.
187. 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.
188. 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(7):1763–1774.
189. Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2004;103(12):4514–4519.
190. Long Zheng X, 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.
191. Jin SY, Skipwith CG, Zheng XL. Amino acid residues Arg659, Arg660, and Tyr 661 in the spacer



- domain of ADAMTS13 are critical for cleavage of von Willebrand factor. *Blood*. 2010;115(11):2300–2310.
192. Yamaguchi Y, Moriki T, Igari A, et al. Epitope analysis of autoantibodies to ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Res.* 2011;128(2):169–173.
  193. Thomas MR, de Groot R, Scully MA, Crawley JTB. Pathogenicity of Anti-ADAMTS13 Autoantibodies in Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *EBioMedicine*. 2015;2(8):942–952.
  194. De Waele L, Curie A, Kangro K, et al. Anti-cysteine/spacer antibodies that open ADAMTS13 are a common feature in iTTP. *Blood Adv.* 2021;5(21):4480–4484.
  195. 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.
  196. Velásquez Pereira LC, Roose E, Graça NAG, et al. Immunogenic hotspots in the spacer domain of ADAMTS13 in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2021;19(2):478–488.
  197. Roose E, Schelpe AS, Joly BS, et al. An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2018;16(2):378–388.
  198. Roose E, Vidarsson G, Kangro K, et al. Anti-ADAMTS13 Autoantibodies against Cryptic Epitopes in Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Thromb. Haemost.* 2018;118(10):1729–1742.
  199. Roose E, Schelpe AS, Tellier E, et al. Open ADAMTS13, induced by antibodies, is a biomarker for subclinical immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2020;136(3):353–361.
  200. Hrdinová J, D'Angelo S, Graça NAG, et al. Dissecting the pathophysiology of immune thrombotic thrombocytopenic purpura: interplay between genes and environmental triggers. *Haematologica*. 2021;106(3):924.
  201. 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.* 2006;4(8):1707–1717.
  202. 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(3):329–336.
  203. George JN. Clinical insights from observations on ADAMTS13 deficiency in liver cirrhosis. *Thromb. Haemost.* 2008;99(6):987–988.

204. Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, et al. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb. Haemost.* 2008;99(6):1019–1029.
205. Ono T, Mimuro J, Madoiwa S, et al. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation: its correlation with development of renal failure. *Blood.* 2006;107(2):528–534.
206. Peigne V, Azoulay E, Coquet I, et al. The prognostic value of ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13) deficiency in septic shock patients involves interleukin-6 and is not dependent on disseminated intravascular coagulation. *Crit. Care.* 2013;17(6):R273.
207. Joly BS, Roose E, Coppo P, Vanhoorelbeke K, Veyradier A. ADAMTS13 conformation is closed in non-immune acquired thrombotic thrombocytopenic purpura of unidentified pathophysiology (uTTP). *Haematologica.* 2022;(SE-Letters to the Editor):
208. Bendapudi PK, Li A, Hamdan A, et al. Derivation and Prospective Validation of a Predictive Score for the Rapid Diagnosis of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: The Plasmic Score. *Blood.* 2014;124(21):231–231.
209. Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, et al. ISTH guidelines for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(10):2496–2502.
210. Fage N, Orvain C, Henry N, et al. Proteinuria Increases the PLASMIC and French Scores Performance to Predict Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in Patients With Thrombotic Microangiopathy Syndrome. *Kidney Int. reports.* 2022;7(2):221–231.
211. Burguet L, Taton B, Prezelin-Reydit M, et al. Urine Protein/Creatinine Ratio in Thrombotic Microangiopathies: A Simple Test to Facilitate Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic and Uremic Syndrome Diagnosis. *J. Clin. Med.* 2022;11(3):648.
212. Studt JD, Böhaa M, Budde U, et al. Measurement of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: A multicenter comparison of different assay methods. *J. Thromb. Haemost.* 2003;1(9):1882–1887.
213. Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, et al. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(4):631–640.
214. Tripodi A, Peyvandi F, Chantarangkul V, et al. Second international collaborative study evaluating performance characteristics of methods measuring the von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13). *J. Thromb. Haemost.* 2008;6(9):1534–1541.
215. Remuzzi G, Galbusera M, Noris M, et al. Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2002;100(3):778–785.
216. Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Lämmle B, Furlan M. Assay of von Willebrand factor

- (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF. A tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thromb. Haemost.* 1999;82(5):1386–1389.
217. Böhm M, Vigh T, Scharrer I. Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Ann. Hematol.* 2002;81(8):430–435.
218. Obert B, Tout H, Veyradier A, et al. Estimation of the von Willebrand factor-cleaving protease in plasma using monoclonal antibodies to vWF. *Thromb. Haemost.* 1999;82(5):1382–1385.
219. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br. J. Haematol.* 2005;129(1):93–100.
220. Mackie I, Mancini I, Muia J, et al. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for laboratory measurement of ADAMTS13. *Int. J. Lab. Hematol.* 2020;42(6):685–696.
221. Joly BS, Stepanian A, Hajage D, et al. Evaluation of a chromogenic commercial assay using VWF-73 peptide for ADAMTS13 activity measurement. *Thromb. Res.* 2014;134(5):1074–1080.
222. Jin M, Cataland S, Bissell M, Wu HM. A rapid test for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura using surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF)-mass spectrometry. *J. Thromb. Haemost.* 2006;4(2):333–338.
223. Mirabet M, Blanch S, Puig J, Serra J. Highly sensitive fully automated chemiluminescent immunoassay for rapid quantification of ADAMTS13 activity. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2017;1:1297.
224. Byrnes JJ, Khurana M. Treatment of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura with Plasma. *N. Engl. J. Med.* 1977;297(25):1386–1389.
225. Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* 1991;325(6):393–397.
226. Bell WR, Ness PM, Kickler TS, Braine HG. Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura–hemolytic uremic syndrome: Clinical experience in 108 patients. *N. Engl. J. Med.* 1991;325(6):398–403.
227. Lara PN, Coe TL, Zhou H, et al. Improved survival with plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Med.* 1999;107(6):573–579.
228. Beloncle F, Buffet M, Coindre JP, et al. Splenectomy and/or cyclophosphamide as salvage therapies in thrombotic thrombocytopenic purpura: The French TMA Reference Center experience. *Transfusion.* 2012;52(11):2436–2444.

229. Chemnitz J, Draube A, Scheid C, et al. Successful treatment of severe thrombotic thrombocytopenic purpura with the monoclonal antibody rituximab. *Am. J. Hematol.* 2002;71(2):105–108.
230. Zheng X, Pallera AM, Goodnough LT, Sadler JE, Blinder MA. Remission of chronic thrombotic thrombocytopenic purpura after treatment with cyclophosphamide and rituximab. *Ann. Intern. Med.* 2003;138(2):105–108.
231. Koulova L, Alexandrescu D, Dutcher JP, et al. Rituximab for the treatment of refractory idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): Report of three cases. *Am. J. Hematol.* 2005;78(1):49–54.
232. Froissart A, Veyradier A, Hié M, Benhamou Y, Coppo P. Rituximab in autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura: A success story. *Eur. J. Intern. Med.* 2015;26(9):659–665.
233. Chen J, Reheman A, Gushiken FC, et al. N-acetylcysteine reduces the size and activity of von Willebrand factor in human plasma and mice. *J. Clin. Invest.* 2011;121(2):593–603.
234. Tersteeg C, Roodt J, Van Rensburg WJ, et al. N-acetylcysteine in preclinical mouse and baboon models of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;129(8):1030–1038.
235. Li GW, Rambally S, Kamboj J, et al. Treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura with N-Acetylcysteine: A case report. *Transfusion.* 2014;54(5):1221–1224.
236. Rottenstreich A, Hochberg-Klein S, Rund D, Kalish Y. The role of N-acetylcysteine in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2016;41(4):678–683.
237. Coppo P. Treatment of autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura in the more severe forms. *Transfus. Apher. Sci.* 2017;56(1):52–56.
238. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, et al. Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(6):511–522.
239. Knöbl P. New treatment options for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie.* 2017;37(3):211–215.
240. Cuker A, Cataland SR, Coppo P, et al. Redefining outcomes in immune TTP: an international working group consensus report. *Blood.* 2021;137(14):1855–1861.
241. Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, et al. Good practice statements (GPS) for the clinical care of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(10):2503–2512.
242. Chen H, Fu A, Wang J, et al. Rituximab as first-line treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Int. Med. Res.* 2017;45(3):1253–1260.
243. Lim W, Vesely SK, George JN. The role of rituximab in the management of patients with acquired

- thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2015;125(10):1526–1531.
244. Abou-Ismaïl MY, Arafah Y, Fu P, et al. Outcomes of Immune Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (iTTP) With Upfront Cyclophosphamide vs. Rituximab. *Front. Med.* 2020;7:588526.
  245. Cataland SR, Jin M, Zheng XL, George JN, Wu HM. An evaluation of cyclosporine alone for the treatment of early recurrences of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2006;4(5):1162–1164.
  246. Doyle AJ, Stubbs MJ, Lester W, et al. The use of obinutuzumab and ofatumumab in the treatment of immune thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* 2022;
  247. Van Den Berg J, Hovinga JAK, Pflieger C, et al. Daratumumab for immune thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv.* 2022;6(3):993–997.
  248. Eskazan AE. Bortezomib therapy in patients with relapsed/refractory acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann. Hematol.* 2016;95(11):1751–1756.
  249. Azapağasi E, Uysal Yazici M, Eroğlu N, et al. Successful Treatment With Bortezomib for Refractory and Complicated Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura in an Adolescent Girl. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2021;43(4):e587–e591.
  250. Peyvandi F, Callewaert F. Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(25):2497–2498.
  251. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, et al. Caplacizumab reduces the frequency of major thromboembolic events, exacerbations and death in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2017;15(7):1448–1452.
  252. Knöbl P, Scully M, Cataland SR, et al. Integrated Efficacy Results from the Phase II and Phase III Studies with Caplacizumab in Patients with Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Blood*. 2018;132(Suppl. 1):3739.
  253. Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, et al. ISTH guidelines for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(10):2496–2502.
  254. 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.
  255. Kopic A, Benamara K, Piskernik C, et al. Preclinical assessment of a new recombinant ADAMTS-13 drug product (BAX930) for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14(7):1410–1419.
  256. Kleinveld DJB, Simons DDG, Dekimpe C, et al. Plasma and rhADAMTS13 reduce trauma-induced organ failure by restoring the ADAMTS13-VWF axis. *Blood Adv.* 2021;5(17):3478–3491.
  257. Scully M, Knöbl P, Kentouche K, et al. Recombinant ADAMTS-13: first-in-human

- pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2017;130(19):2055–2064.
258. Graça NAG, Ercig B, Pereira LCV, et al. Modifying ADAMTS13 to modulate binding of pathogenic autoantibodies of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2020;105(11):2619–2630.
259. Ercig B, Graça NAG, Kangro K, et al. N-glycan-mediated shielding of ADAMTS13 prevents binding of pathogenic autoantibodies in immune-mediated TTP. *Blood*. 2021;137(19):2694–2698.
260. Pavenski K, Huang SHS, Patriquin CJ. Predictors of relapse and preventative strategies in immune thrombotic thrombocytopenic purpura. *Expert Rev. Hematol*. 2021;14(11):1027–1040.
261. 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.
262. Westwood J-P, Thomas M, Alwan F, et al. Rituximab prophylaxis to prevent thrombotic thrombocytopenic purpura relapse: outcome and evaluation of dosing regimens. *Blood Adv*. 2017;1(15):1159–1166.
263. Jestin M, Benhamou Y, Schelpe AS, et al. Preemptive rituximab prevents long-term relapses in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2018;132(20):2143–2153.
264. Deford CC, Reese JA, Schwartz LH, et al. Multiple major morbidities and increased mortality during long-term follow-up after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2013;122(12):2023–2029.
265. Roriz M, Landais M, Desprez J, et al. Risk factors for autoimmune diseases development after thrombotic thrombocytopenic purpura. *Med. (United States)*. 2015;94(42):e1598.
266. Upreti H, Kasmani J, Dane K, et al. Reduced ADAMTS13 activity during TTP remission is associated with stroke in TTP survivors. *Blood*. 2019;134(13):1037–1045.
267. Brodsky MA, Sukumar S, Selvakumar S, et al. Major adverse cardiovascular events in survivors of immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Hematol*. 2021;96(12):1587–1594.
268. Sukumar S, Brodsky M, Hussain S, et al. Cardiovascular disease is a leading cause of mortality among TTP survivors in clinical remission. *Blood Adv*. 2022;6(4):1264–1270.
269. George JN. TTP: Long-term outcomes following recovery. *Hematol. (United States)*. 2018;2018(1):548–552.
270. Han B, Page EE, Stewart LM, et al. Depression and cognitive impairment following recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Hematol*. 2015;90(8):709–714.
271. Barbot J, Costa E, Guerra M, et al. Ten years of prophylactic treatment with fresh-frozen plasma

- in a child with chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura as a result of a congenital deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease. *Br. J. Haematol.* 2001;113(3):649–651.
272. Sivakumaran M, Roland J. Prophylactic treatment with fresh-frozen plasma in chronic thrombotic thrombocytopenic purpura [1]. *Br. J. Haematol.* 2002;117(2):480.
273. Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, et al. Pregnancy-induced thrombocytopenia and TTP, and the risk of fetal death, in Upshaw-Schulman syndrome: A series of 15 pregnancies in 9 genotyped patients. *Br. J. Haematol.* 2009;144(5):742–754.
274. Reese JA, Peck JD, Deschamps DR, et al. Platelet Counts during Pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 2018;379(1):32–43.
275. Sie P, Caron C, Azam J, et al. Reassessment of von Willebrand factor (VWF), VWF propeptide, factor VIII:C and plasminogen activator inhibitors 1 and 2 during normal pregnancy. *Br. J. Haematol.* 2003;121(6):897–903.
276. Szecsi PB, Jørgensen M, Klajnbard A, et al. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb. Haemost.* 2010;103(4):718–727.
277. Cui C, Yang S, Zhang J, et al. Trimester-specific coagulation and anticoagulation reference intervals for healthy pregnancy. *Thromb. Res.* 2017;156:82–86.
278. Gong JM, Shen Y, He YX. Reference Intervals of Routine Coagulation Assays During the Pregnancy and Puerperium Period. *J. Clin. Lab. Anal.* 2016;30(6):912–917.
279. Fu M, Liu J, Xing J, et al. Reference intervals for coagulation parameters in non-pregnant and pregnant women. *Sci. Rep.* 2022;12(1):1519.
280. Epiney M, Boehlen F, Boulvain M, et al. D-dimer levels during delivery and the postpartum. *J. Thromb. Haemost.* 2005;3(2):268–271.
281. Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The role of gender and organ specific autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2012;11(6–7):A377–A385.
282. Borba VV, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Exacerbations of autoimmune diseases during pregnancy and postpartum. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2019;33(6):101321.
283. Somers EC. Pregnancy and autoimmune diseases. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2020;64:3–10.
284. Aagaard-Tillery KM, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 2006;11(5):279–295.
285. Orefice R. Immunology and the immunological response in pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2021;76:3–12.
286. Sykes L, MacIntyre DA, Yap XJ, Teoh TG, Bennett PR. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy

- and preterm labour. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:967629.
287. Chen S-J, Liu Y-L, Sytwu H-K. Immunologic Regulation in Pregnancy: From Mechanism to Therapeutic Strategy for Immunomodulation. *Clin. Dev. Immunol.* 2012;2012:1–10.
288. Westwood JP, Langley K, Heelas E, Machin SJ, Scully M. Complement and cytokine response in acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Br. J. Haematol.* 2014;164(6):858–866.
289. Recalde G, Moreno-Sosa T, Yúdica F, et al. Contribution of sex steroids and prolactin to the modulation of T and B cells during autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2018;17(5):504–512.
290. WE F, JN G, LN D, DA S. Thrombotic thrombocytopenic purpura. Occurrence two years apart during late pregnancy in two sisters. *JAMA.* 1976;235(19):2126–2127.
291. Miodownik S, Pikovsky O, Erez O, et al. Unfolding the pathophysiology of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in pregnancy: lessons from a cluster of familial cases. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2021;225(2):177.e1-177.e15.
292. Coppo P, Veyradier A. TTP in the setting of pregnancy: The story still has to be written. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(10):2775–2777.
293. Brosens I, Puttemans P, Benagiano G. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2019;221(5):437–456.
294. Scully M. How to evaluate and treat the spectrum of TMA syndromes in pregnancy. *Hematology.* 2021;2021(1):545–551.
295. Luo H, Li D, Gao F, Hong P, Feng W. A meta-analysis of neonatal outcomes in pregnant women with immune thrombocytopenic purpura. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2021;47(9):2941–2953.
296. George JN, Nester CM, McIntosh JJ. Syndromes of thrombotic microangiopathy associated with pregnancy. *Hematology.* 2015;2015(1):644–648.
297. Olié V, Moutengou E, Grave C, et al. Prevalence of hypertensive disorders during pregnancy in France (2010-2018): The Nationwide CONCEPTION Study. *J. Clin. Hypertens.* 2021;23(7):1344–1353.
298. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2019;145 Suppl 1(Suppl 1):1–33.
299. Duley L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Semin. Perinatol.* 2009;33(3):130–137.
300. Ananth C V., Keyes KM, Wapner RJ. Pre-eclampsia rates in the United States, 1980-2010: age-period-cohort analysis. *BMJ.* 2013;347(nov07 15):f6564–f6564.



301. Brown MA, Magee LA, Kenny LC, et al. The hypertensive disorders of pregnancy: ISSHP classification, diagnosis & management recommendations for international practice. *Pregnancy Hypertens.* 2018;72(1):24–43.
302. Joseph KS, Boutin A, Lisonkova S, et al. Maternal Mortality in the United States. *Obstet. Gynecol.* 2021;137(5):763–771.
303. Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, et al. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2016;387(10022):999–1011.
304. Ives CW, Sinkey R, Rajapreyar I, Tita ATN, Oparil S. Preeclampsia—Pathophysiology and Clinical Presentations. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020;76(14):1690–1702.
305. Tsatsaris V, Fournier T, Winer N. Physiopathologie de la prééclampsie. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 2010;29(3):e13–e18.
306. Karumanchi SA, Epstein FH. Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: Cause or consequence of preeclampsia? *Kidney Int.* 2007;71(10):959–961.
307. Tjoa ML, Levine RJ, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Front. Biosci.* 2007;12(7):2395–2402.
308. Lu F, Longo M, Tamayo E, et al. The effect of over-expression of sFlt-1 on blood pressure and the occurrence of other manifestations of preeclampsia in unrestrained conscious pregnant mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2007;196(4):396.e1-396.e7.
309. Rana S, Lemoine E, Granger J, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ. Res.* 2019;124(7):1094–1112.
310. Zeisler H, Llorca E, Chantraine F, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PIGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(1):13–22.
311. Tasta O, Parant O, Hamdi SM, et al. Evaluation of the Prognostic Value of the sFlt-1/PIGF Ratio in Early-Onset Preeclampsia. *Am. J. Perinatol.* 2021;38(S 01):e292–e298.
312. Lim S, Li W, Kemper J, et al. Biomarkers and the Prediction of Adverse Outcomes in Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Obstet. Gynecol.* 2021;137(1):72–81.
313. Hund M, Allegranza D, Schoedl M, et al. Multicenter prospective clinical study to evaluate the prediction of short-term outcome in pregnant women with suspected preeclampsia (PROGNOSIS): study protocol. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14(1):324.
314. Stepanian A, Cohen-Moatti M, Sanglier T, et al. Von Willebrand factor and ADAMTS13: a candidate couple for preeclampsia pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(7):1703–9.
315. ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 2019;133(1):e1–e25.

316. Haram K, Svendsen E, Abildgaard U. The HELLP syndrome: Clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2009;9:8.
317. Martin JN, Morris RF. Preeclampsia-spectrum hypertensive disorders of pregnancy: Gestational hypertension, preeclampsia, eclampsia, chronic hypertension, and HELLP syndrome. *Sex Differ. Cardiovasc. Physiol. Pathophysiol*. 2019;121–136.
318. Bruel A, Kavanagh D, Noris M, et al. Hemolytic uremic syndrome in pregnancy and postpartum. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2017;12(8):1237–1247.
319. Huerta A, Arjona E, Portoles J, et al. A retrospective study of pregnancy-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. 2018;93(2):450–459.
320. Sarno L, Tufano A, Maruotti GM, et al. Eculizumab in pregnancy: a narrative overview. *J. Nephrol*. 2019;32(1):17–25.
321. Socié G, Caby-Tosi MP, Marantz JL, et al. Eculizumab in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and atypical haemolytic uraemic syndrome: 10-year pharmacovigilance analysis. *Br. J. Haematol*. 2019;185(2):297–310.
322. Stefanovic V. The Extended Use of Eculizumab in Pregnancy and Complement Activation–Associated Diseases Affecting Maternal, Fetal and Neonatal Kidneys-The Future Is Now? *J. Clin. Med*. 2019;8(3):407.
323. Carmi O, Berla M, Shoenfeld Y, Levy Y. Diagnosis and management of catastrophic antiphospholipid syndrome. *Expert Rev. Hematol*. 2017;10(4):365–374.
324. Garcia D, Erkan D. Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome. *N. Engl. J. Med*. 2018;378:2010–2021.
325. Fuentes Carrasco M, Mayoral Triana A, Cristóbal García IC, et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome during pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*. 2021;264:21–24.
326. Marder W. Update on pregnancy complications in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol*. 2019;31(6):650–658.
327. Nelson DB, Byrne JJ, Cunningham FG. Acute Fatty Liver of Pregnancy. *Obstet. Gynecol*. 2021;137(3):535–546.
328. Erez O, Mastrolia SA, Thachil J. Disseminated intravascular coagulation in pregnancy: Insights in pathophysiology, diagnosis and management. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2015;213(4):452–463.
329. Adelborg K, Larsen JB, Hvas A. Disseminated intravascular coagulation: epidemiology, biomarkers, and management. *Br. J. Haematol*. 2021;192(5):803–818.
330. Sakai K, Fujimura Y, Nagata Y, et al. Success and limitations of plasma treatment in pregnant women with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost*. 2020;18(11):2929–2941.

331. Tanaka H, Tenkumo C, Mori N, et al. Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2014;40(1):247–249.
332. Borogovac A, Reese JA, Gupta S, George JN. Morbidities and mortality in patients with hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv.* 2022;6(3):750–759.
333. Phelps AJD, Kolettis D. Understanding treatment response in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura to aid in pregnancy counseling and management. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2022;226(4):594.
334. Chakravarty EF, Murray ER, Kelman A, Farmer P. Pregnancy outcomes after maternal exposure to rituximab. *Blood.* 2011;117(5):1499–506.
335. Al-Husban N, Al-Kuran O. Post-Partum Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) in a Patient with known Idiopathic (Immune) Thrombocytopenic Purpura: a case report and review of the literature. *J. Med. Case Rep.* 2018;12(1):147.
336. Scully M, Starke R, Lee R, et al. Successful management of pregnancy in women with a history of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2006;17(6):459–463.
337. Kühne L, Völker LA, Hagmann H, et al. First use of the anti-VWF nanobody caplacizumab to treat iTTP in pregnancy. *Br. J. Haematol.* 2022;196(3):e30–e33.
338. Fakhouri F, Scully M, Provot F, et al. Management of thrombotic microangiopathy in pregnancy and postpartum: Report from an international working group. *Blood.* 2020;136(19):2103–2117.
339. Ferrari B, Maino A, Lotta LA, et al. Pregnancy complications in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: a case-control study. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014;9:193.
340. Hubbard AR, Heath AB, Kremer Hovinga JA. Establishment of the WHO 1st International Standard ADAMTS13, plasma (12/252): Communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(6):1151–1153.
341. 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.
342. Deforche L, Roose E, Vandebulcke 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.
343. 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(4):466–471.
344. Benhamou Y, Assié C, Boelle PY, et al. 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(8):1181–1186.
345. Jamme M, Rondeau E. The PLASMIC score for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet Haematol*. 2017;4(4):e148–e149.
346. Favresse J, Lardinois B, Chatelain B, Jacquemin H, Mullier F. Evaluation of the Fully Automated HemosIL Acustar ADAMTS13 Activity Assay. *Thromb. Haemost.* 2018;118(5):942–944.
347. Valsecchi C, Mirabet M, Mancini I, et al. Evaluation of a New, Rapid, Fully Automated Assay for the Measurement of ADAMTS13 Activity. *Thromb. Haemost.* 2019;119(11):1767–1772.
348. Stratmann J, Ward J-N, Miesbach W. Evaluation of a rapid turn-over, fully-automated ADAMTS13 activity assay: a method comparison study. *J. Thromb. Thrombolysis*. 2020;50(3):628–631.
349. Favaloro EJ, Mohammed S, Chapman K, et al. A multicenter laboratory assessment of a new automated chemiluminescent assay for ADAMTS13 activity. *J. Thromb. Haemost.* 2021;19(2):417–428.
350. Jiang Y, McIntosh JJ, Reese JA, et al. Pregnancy outcomes following recovery from acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2014;123(11):1674–1680.
351. Dap M, Romiti J, Dolenc B, Morel O. Thrombotic thrombocytopenic purpura and severe preeclampsia: a clinical overlap during pregnancy and a possible coexistence. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 2022;51(7):102422.
352. Camilleri RS, Cohen H, Mackie IJ, 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.
353. Zhu J, Muia J, Gupta G, et al. Exploring the “minimal” structure of a functional ADAMTS13 by mutagenesis and small-angle X-ray scattering. *Blood*. 2019;133(17):1909–1918.
354. Zhang X, Halvorsen K, Zhang CZ, Wong WP, Springer TA. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein, von Willebrand Factor. *Science*. 2009;324(5932):1330.
355. Joly BS, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2017;129(21):2836–2846.
356. George JN. The thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndromes: overview of pathogenesis (Experience of The Oklahoma TTP-HUS Registry, 1989–2007). *Kidney Int.* 2009;75(SUPPL. 112):S8–S10.
357. Fakhouri F. Pregnancy-related thrombotic microangiopathies: Clues from complement biology. *Transfus. Apher. Sci.* 2016;54(2):199–202.
358. Neave L, Scully M. Microangiopathic Hemolytic Anemia in Pregnancy. *Transfus. Med. Rev.*

- 2018;32(4):.
359. Camilleri RS, Scully M, Thomas M, et al. A phenotype-genotype correlation of ADAMTS13 mutations in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura patients treated in the United Kingdom. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10(9):1792–1801.
  360. Beranger N, Benghezal S, Joly BS, et al. Diagnosis and follow-up of thrombotic thrombocytopenic purpura with an automated chemiluminescent ADAMTS13 activity immunoassay. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2021;5(1):81–93.
  361. Dekimpe C, Roose E, Tersteeg C, et al. Anti-ADAMTS13 autoantibodies in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura do not hamper ELISA-based quantification of ADAMTS13 antigen. *J. Thromb. Haemost.* 2020;18(4):985–990.
  362. Mancini I, Valsecchi C, Lotta LA, et al. FRETS-VWF73 rather than CBA assay reflects ADAMTS13 proteolytic activity in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura patients. *Thromb. Haemost.* 2014;112(2):297–303.
  363. Rana S, Hacker MR, Modest AM, et al. Circulating Angiogenic Factors and Risk of Adverse Maternal and Perinatal Outcomes in Twin Pregnancies With Suspected Preeclampsia. *Hypertension.* 2012;60(2):451–458.
  364. Vesely SK. Life after acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: Morbidity, mortality, and risks during pregnancy. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13(S1):S216–S222.
  365. Luken BM, Turenhout EAM, Hulstein JJJ, et al. The spacer domain of ADAMTS13 contains a major binding site for antibodies in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb. Haemost.* 2005;93(2):267–274.
  366. Kangro K, Roose E, Joly BS, et al. Anti-ADAMTS13 autoantibody profiling in patients with immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv.* 2021;5(17):3427–3435.
  367. Kremer Hovinga JA, George JN. Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N. Engl. J. Med.* 2019;381(17):1653–1662.
  368. Roose E, Tersteeg C, Demeersseman R, et al. Anti-ADAMTS13 Antibodies and a Novel Heterozygous p.R1177Q Mutation in a Case of Pregnancy-Onset Immune-Mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *TH open companion J. to Thromb. Haemost.* 2018;2(1):e8–e15.
  369. Vaidya D, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, et al. A common variant in the Von Willebrand factor gene is associated with multiple functional consequences. *Am. J. Hematol.* 2010;85(12):971–973.
  370. Zabaneh D, Gaunt TR, Kumari M, et al. Genetic variants associated with Von Willebrand factor levels in healthy men and women identified using the HumanCVD BeadChip. *Ann. Hum. Genet.* 2011;75(4):456–467.

371. Van Loon JE, Kavousi M, Leebeek FWG, et al. von Willebrand factor plasma levels, genetic variations and coronary heart disease in an older population. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10(7):1262–1269.
372. Tang W, Cushman M, Green D, et al. Gene-centric approach identifies new and known loci for FVIII activity and VWF antigen levels in European Americans and African Americans. *Am. J. Hematol.* 2015;90(6):534–540.
373. Parimi N, Tromp G, Kuivaniemi H, et al. Analytical approaches to detect maternal/fetal genotype incompatibilities that increase risk of pre-eclampsia. *BMC Med. Genet.* 2008;9(1):60.
374. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, et al. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 1996;334(17):1090–1094.
375. Goldschmidt-Clermont PJ, Shear WS, Schwartzberg J, Varga CF, Bray PF. Clues to the death of an Olympic champion. *Lancet (London, England)*. 1996;347(9018):1833.
376. Knowles JW, Wang H, Itakura H, et al. Association of polymorphisms in platelet and hemostasis system genes with acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 2007;154(6):1052–1058.
377. Kucharska-Newton AM, Monda KL, Campbell S, et al. Association of the platelet GPIIb/IIIa polymorphism with atherosclerotic plaque morphology: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis.* 2011;216(1):151–156.
378. Khatami M, Heidari MM. Common rs5918 (PIA1/A2) polymorphism in the ITGB3 gene and risk of coronary artery disease. *Arch. Med. Sci. – Atheroscler. Dis.* 2016;1(1):9–15.
379. Komsa-Penkova R, Golemanov G, Tsankov B, et al. Rs5918ITGB3 Polymorphism, Smoking, and BMI as Risk Factors for Early Onset and Recurrence of DVT in Young Women. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2017;23(6):585–595.
380. Fawzy MS, Toraih EA, Aly NM, et al. Atherosclerotic and thrombotic genetic and environmental determinants in Egyptian coronary artery disease patients: a pilot study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2017;17(1):26.
381. Karami F, Askari M, Modarressi M. Investigating Association of rs5918 Human Platelets Antigen 1 and rs1800790 Fibrinogen  $\beta$  Chain as Critical Players with Recurrent Pregnancy Loss. *Med. Sci. (Basel, Switzerland)*. 2018;6(4):98.
382. Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, et al. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 2005;115(10):2752–2761.
383. Chauhan AK, Walsh MT, Zhu G, et al. The combined roles of ADAMTS13 and VWF in murine models of TTP, endotoxemia, and thrombosis. *Blood.* 2008;111(7):3452–3457.
384. [https://lecrat.fr/spip.php?page=article&id\\_article=1105](https://lecrat.fr/spip.php?page=article&id_article=1105).
385. [https://clinicaltrials.gov/ProvidedDocs/23/NCT01151423/Prot\\_000.pdf](https://clinicaltrials.gov/ProvidedDocs/23/NCT01151423/Prot_000.pdf).

## ANNEXES

- 1) Joly BS, Beranger N, Benhamou Y, Coppo P, Veyradier A. Actualités dans le purpura thrombotique thrombocytopénique. *Hématologie*. 2021;27(4) :188-199
- 2) Delrue M, Siguret V, Neuwirth M, Joly BS, Beranger N, Sène D, Chousterman BG, Voicu S, Bonnin P, Mégarbane B, Stepanian A. von Willebrand factor/ADAMTS13 axis and venous thromboembolism in moderate-to-severe COVID-19 patients. *Br J Haematol*. 2021;192(6):1097-1100
- 3) Joly BS, Darmon M, Dekimpe C, Dupont T, Dumas G, Yvin E, Beranger N, Vanhoorelbeke K, Azoulay E, Veyradier A. Imbalance of von Willebrand factor and ADAMTS13 axis is rather a biomarker of strong inflammation and endothelial damage than a cause of thrombotic process in critically ill COVID-19 patients. *J Thromb Haemost*. 2021;19(9):2193-2198
- 4) Graça NAG, Joly BS, Voorberg J, Vanhoorelbeke K, Beranger N, Veyradier A, Coppo P. TTP: From empiricism for an enigmatic disease to targeted molecular therapies. *Br J Haematol*. 2022;197(2):156-170

# Developments in thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13

**Bérangère Joly**, Service d'hématologie biologique, hôpital Lariboisière, AP-HP, Nord, Université de Paris, Paris, France  
Sous l'égide du Centre national de référence des microangiopathies thrombotiques, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, Paris, France; EA3518, Recherche clinique en hématologie, immunologie et transplantation, institut de recherche Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

**Nicolas Beranger**, Service d'hématologie biologique, hôpital Lariboisière, AP-HP, Nord, Université de Paris, Paris, France  
Sous l'égide du Centre national de référence des microangiopathies thrombotiques, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, Paris, France; EA3518, Recherche clinique en hématologie, immunologie et transplantation, institut de recherche Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

**Ygal Benhamou**, Normandie Univ, UNIROUEN, U1096, CHU Rouen, service de médecine interne, Rouen, France

**Paul Coppo**, Service d'hématologie, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, Paris, France

**Agnès Veyradier**, Service d'hématologie biologique, hôpital Lariboisière, AP-HP, Nord, Université de Paris, Paris, France  
Sous l'égide du Centre national de référence des microangiopathies thrombotiques, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Sorbonne Université, Paris, France; EA3518, Recherche clinique en hématologie, immunologie et transplantation, institut de recherche Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

Correspondence : A. Veyradier  
[agnes.veyradier@aphp.fr](mailto:agnes.veyradier@aphp.fr)

*Actualités dans le purpura thrombotique thrombocytopénique et ADAMTS13*

ADAMTS13, von Willebrand factor, thrombotic thrombocytopenic purpura, haemostasis, thrombotic microangiopathy

To cite this article: Joly B, Beranger N, Benhamou Y, Coppo P, Veyradier A. Developments in thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13. *Hématologie* 2021; xx(x): 1-12. doi: 10.1684/hma.2021.1701

doi: 10.1684/hma.2021.1701





## Abstract

**T**hrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is a specific form of thrombotic microangiopathy arising from a severe functional deficiency of ADAMTS13, the specific Von Willebrand factor (VWF) cleaving protease. This defect leads to the accumulation of hyperadhesive VWF high-molecular-weight multimers and to the spontaneous formation of microthrombi in the microcirculation, accompanied by peripheral thrombocytopenia and mechanical haemolytic anaemia. TTP is mainly an acquired disease, most often autoimmune (iTTP) but can also be inherited (cTTP) when deleterious bi-allelic mutations are found in the ADAMTS13 gene (Upshaw-Schulman syndrome). TTP is a relapsing-remitting disease requiring long-term follow-up. TTP is either idiopathic (50%) or associated with a physiological or pathological context such as pregnancy, autoimmune disease, infection, neoplasia or transplantation. TTP is a disease, the diagnosis and management of which have changed dramatically over the last 30 years, mainly due to breakthroughs in the understanding of the relationship between VWF and ADAMTS13. TTP is a therapeutic emergency and can be detected by clinical prediction scores (French Score, PLASMIC Score). However, formal diagnosis relies on the measurement of ADAMTS13 activity, which is  $<10$  IU/dL. Biological confirmation should not delay treatment, particularly the initiation of plasma replacement therapy to provide exogenous ADAMTS13, which is the cornerstone of treatment in the acute phase of TTP. Immunomodulatory therapies, such as rituximab (monoclonal antibody to CD20) are also recommended for iTTP. Finally, caplacizumab, a monoclonal antibody targeting the A1 domain of VWF, has recently joined the therapeutic arsenal after very satisfactory results in terms of reduction of morbidity and mortality according to international clinical trials. A recombinant ADAMTS13 is currently being evaluated with promising preliminary results. Innovative tools to explore anti-ADAMTS13 autoimmunity are emerging: ADAMTS13 conformation and anti-ADAMTS13 antibody epitope-mapping. These tools may allow the identification of subgroups of patients of varying severity and consequently lead to their therapeutic stratification.

## Résumé

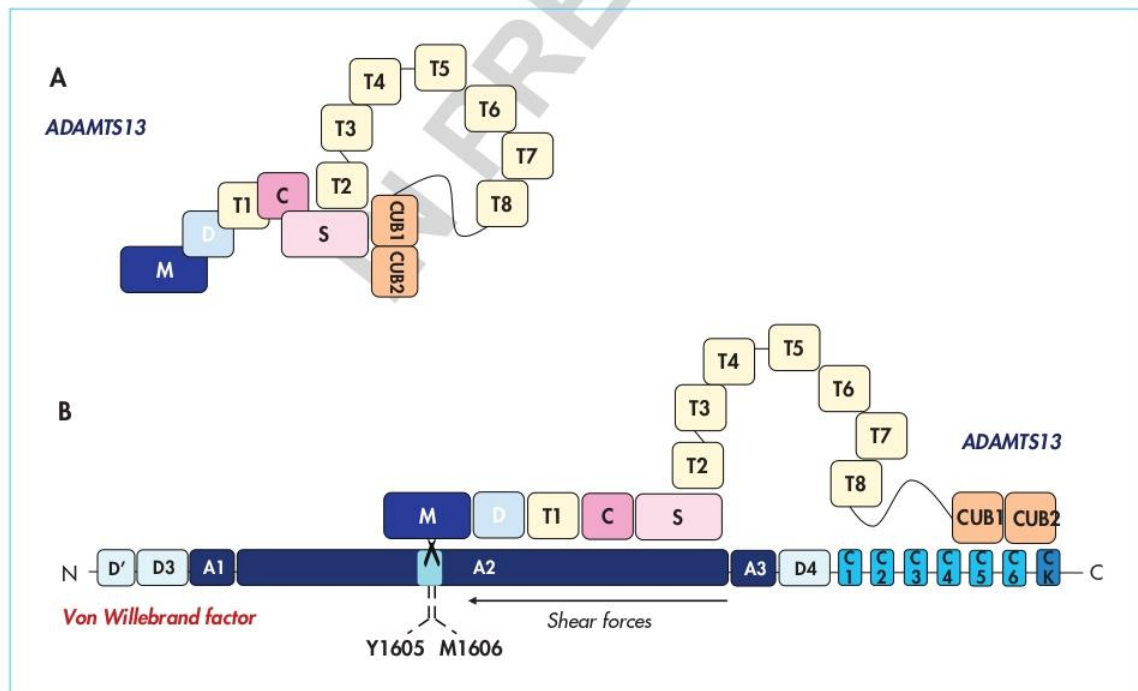
**L**e purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT) est une forme particulière de microangiopathie thrombotique résultant d'un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS13 (pour a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats-13), la protéase spécifique de clivage du facteur Willebrand (VWF). L'accumulation de multimères de haut poids moléculaire de VWF hyperadhésifs aux plaquettes conduit à la formation spontanée de microthrombi dans la microcirculation, accompagnée d'une thrombopénie périphérique et d'une anémie hémolytique mécanique. Le PTT est très majoritairement une maladie acquise, le plus souvent auto-immune (PTTi) mais peut également être congénital (PTTc) et lié à des mutations délétères bi-alléliques du gène ADAMTS13 (syndrome d'Upshaw-Schulman). Le PTT évolue par poussées entrecoupées de rémissions, avec un risque de rechute nécessitant un suivi au long cours. Le PTT est idiopathique dans 50 % des cas, mais il peut également compliquer des contextes physiologiques ou pathologiques (grossesse, maladie auto-immune, infection, néoplasie ou greffe). Le PTT est une pathologie dont le diagnostic et la prise en charge ont drastiquement changé au cours des 30 dernières années, principalement en raison de l'avancée des connaissances sur le couple VWF/ADAMTS13. La PTT est une urgence thérapeutique, et le diagnostic présomptif peut être posé par des scores de probabilité clinicobiologique (French Score, PLASMIC Score). Le diagnostic de certitude repose toutefois sur la mesure de l'activité d'ADAMTS13, attendue effondrée ( $< 10\%$ ). La confirmation biologique ne doit en aucun cas retarder la prise en charge, en particulier l'instauration d'une plasmathérapie substitutive permettant l'apport d'ADAMTS13 exogène, pierre angulaire du traitement de la phase aiguë du PTT. Les traitements immunomodulateurs, notamment le rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20), sont également indiqués dans le PTTi. Enfin, le caplacizumab, un nanocorps dirigé contre le domaine A1 du VWF, a récemment rejoint l'arsenal thérapeutique après des résultats très satisfaisants en termes de diminution de la morbidité, d'après les résultats d'essais cliniques internationaux. Une ADAMTS13 recombinante est actuellement en cours d'évaluation, avec des résultats préliminaires prometteurs. Des outils innovants d'exploration de l'auto-immunité anti-ADAMTS13 émergent : la conformation d'ADAMTS13 et la cartographie des anticorps anti-ADAMTS13. Ces outils pourraient permettre l'identification de sous-groupes de patients de sévérités variables et ainsi conduire à leur stratification thérapeutique.

## Von Willebrand factor and ADAMTS13

Von Willebrand factor (VWF) is a multimeric glycoprotein synthesised by endothelial cells and megakaryocytes. VWF plays a major role in primary haemostasis and is essential for platelet adhesion to the sub-endothelium exposed by vascular breach as well as for the aggregation of platelets in the blood stream under high shear forces (microcirculation). The haemostatic power of VWF regarding platelets and the sub-endothelium is proportional to its degree of multimerisation [1].

In 1996, the specific VWF cleavage protease, capable of regulating the distribution of VWF multimers, was partially purified from human plasma by two independent groups [2, 3]. In 2001, thanks to the genomic approach, this protease was identified as the 13<sup>th</sup> member of the family of ADAMTS proteases (for a *disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats*), and is, therefore, referred to as ADAMTS13 [4]. The ADAMTS13 gene is located on chromosome 9q34 and comprises 29 exons. ADAMTS13 is a single-stranded glycoprotein of 1,427 amino acids (190 kDa), synthesised in liver perisinusoidal stellate cells, endothelial cells and megakaryocytes. It is secreted into plasma at a concentration of about 1 mg/mL and has a plasma half-life of two to three days [5]. The mature protease consists of the following structural domains: a metalloprotease (M), disintegrin (D), thrombospondin type 1 (T1), cysteine-rich domain (C), *spacer* (S), seven thrombospondin type 1 domains (T2-T8) and two CUB domains (*Complement, sea Urchin EGF and Bone morphogenetic protein, corresponding to these three proteins*) [6]. The native conformation of ADAMTS13 is closed and maintained by an interaction between its *spacer domain* and its CUB domains, inhibiting the metalloprotease domain rendering it cryptic. The interaction between ADAMTS13 and its substrate, VWF, is specific. The T8-CUB2 domains of ADAMTS13 bind to the D4CK domains of VWF. Allosteric activation of ADAMTS13 allows exposure of its cryptic catalytic site (M) which can bind to the A2 domain of VWF in the presence of high intravascular shear forces or within an arterial thrombus, cleaving it at the Tyr1605-Met1606 peptide bridge [7] (figure 1).

FIGURE 1



Interaction between Von Willebrand factor (VWF) and ADAMTS13. VWF is a mosaic protein composed of several domains: D1-D2-D'-D3-A1 A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK. ADAMTS13 is a single-stranded glycoprotein with the following structural domains: a metalloprotease (M), disintegrin (D), thrombospondin type 1 (T1), cysteine-rich domain (C), *spacer* (S), seven thrombospondin type 1 domains (T2-T8) and two CUB domains. ADAMTS13 adopts a closed conformation through an interaction between its *spacer domain* and its two CUB domains (A). Auto-inhibition at the level of the *spacer domain* and the two CUB domains can be overcome by the interaction between ADAMTS13 and its substrate, VWF (B).





### Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura

In 1924, Eli Moschcowitz described the first fatal case of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) in a 16-year-old girl [8]. In 1982, Moake *et al.* reported the presence of platelet thrombi rich in very high-molecular-weight multimers of VWF in the microvessels of patients with TTP [9]. In 1998, after being purified from human plasma, the specific VWF cleavage protease was studied in patients with TTP [10, 11]. TTP is a specific form of thrombotic microangiopathy (TMA) and the interaction between VWF and ADAMTS13 is crucial in the pathophysiology of the disease. Severe functional deficiency of ADAMTS13 (activity < 10 IU/dL) is responsible for the accumulation of high-molecular-weight VWF multimers and spontaneous formation of microthrombi composed of VWF agglutinates and platelets, resulting in severe peripheral thrombocytopenia (<  $30 \times 10^9/L$ ) [10, 11]. The microthrombi obstruct the microcirculation, causing, on the one hand, mechanical haemolytic anaemia, with the appearance of schistocytes, and, on the other hand, tissue ischaemia of varying severity, defining the TMA syndrome [12]. Severe ADAMTS13 deficiency, pathognomonic for TTP, is [4, 13]:

- either acquired (aTTP) and mainly mediated by anti-ADAMTS13 autoantibodies (iTTP),
- or congenital (cTTP) and associated with the presence of biallelic mutations in the ADAMTS13 gene (autosomal recessive disease, Upshaw-Schulman syndrome).

### Clinical presentation of thrombotic thrombocytopenic purpura

The clinical picture of a TTP flare-up can be extremely variable, but mainly involves signs related to anaemia and severe thrombocytopenia (asthenia, dyspnoea, mucocutaneous purpura, *etc.*), neurological involvement (60% of cases; headache, confusion, ischaemic stroke or seizure), and sometimes intestinal (35%), cardiac (25%) and renal (20%; proteinuria, haematuria) involvement (*figure 2*). TTP is a disease that progresses with unpredictable acute events interspersed with periods of remission of varying duration. The inaugural acute event of TTP is either idiopathic (50% of cases) or associated with a particular clinical context (50%; mainly infection and autoimmune disease, neoplasia, organ or haematopoietic stem cell transplant, *etc.*) (*Table 1*).

### Epidemiology of thrombotic thrombocytopenic purpura

TTP is a rare disease with an estimated incidence of 1.5 new cases per million people per year and a prevalence of 4–10 cases per million people [14]. There is a clear predominance of females in the acquired autoimmune form (sex ratio F/M = 2 to 3.5) [13, 14]. The first acute event of TTP occurs mainly in adulthood (90% of cases), but the diagnosis of TTP should also be made in childhood (10% of cases) so as not to delay specific treatment. The distribution of acquired and congenital forms differs according to the age of the first acute event (*figure 3*). In adults, aTTP accounts for 98% of all cases of TTP, and cTTP is reported in fewer than 2% of cases; it is revealed mainly in obstetrical settings [14, 15]. In children, aTTP and cTTP account for approximately 70% and 30% of cases, respectively [16, 17].

### Diagnostic strategy of thrombotic thrombocytopenic purpura

In the event of suspected TMA syndrome, certain investigations, in particular, should be implemented based on the overall flowchart of investigation for ADAMTS13. The French Score [18] and the PLASMIC Score [19] are predictive of severe ADAMTS13 deficiency. These scores have been developed to assist in the presumptive diagnosis of TTP, allowing rapid initiation of treatment (plasma replacement therapy, *see below*), limiting the morbidity of this disease.

Table 1

**Demographic, clinical and biological characteristics of the French thrombotic thrombocytopenic purpura cohort (based on Mariotte *et al.* [14]).**

|  | Total (n = 772)   | Idiopathic TTP (n = 378) | Non-idiopathic TTP (n = 394) | p        |
|--|-------------------|--------------------------|------------------------------|----------|
| Age                                    | 43 (32–59)        | 42 (31–53)               | 45 (32–60)                   | < 0.0001 |
| Women                                  | 525 (68 %)        | 257 (68 %)               | 268 (68 %)                   | 0.75     |
| Men                                    | 247 (32 %)        | 121 (32 %)               | 126 (32 %)                   |          |
| Neurological impairment                | 471 (61 %)        | 249 (66 %)               | 221 (56 %)                   | 0.011    |
| Fever                                  | 309 (40 %)        | 140 (37 %)               | 169 (43 %)                   | 0.072    |
| Digestive disorders                    | 270 (35 %)        | 144 (38 %)               | 126 (32 %)                   | 0.043    |
| Albuminemia (g/L)                      | 77 (65–91)        | 77 (63–92)               | 75 (66–89)                   | 0.052    |
| Platelet count ( $\times 10^9/L$ )     | 15 (9–30)         | 14 (9–22)                | 20 (9–39)                    | < 0.0001 |
| Creatinine (mmol/L)                    | 126 (87–204)      | 115 (84–163)             | 148 (89–250)                 | 0.0006   |
| LDH (U/mL)                             | 1,596 (988–2,715) | 1,707 (1,001–2,752)      | 1,500 (885–2,703)            | 0.49     |
| Anti-ADAMTS13 IgG positive (> 15 U/mL) | 564 (73 %)        | 336 (89 %)               | 228 (58 %)                   | < 0.0001 |

Quantitative parameters are expressed as median and interquartile range and qualitative parameters as number and percentage. All tests were considered statistically significant for  $p < 0.05$ . A  $\chi^2$  test was performed to compare demographic and clinical variables; a Mann-Whitney test was performed to compare biological parameters.

The measurement of ADAMTS13 activity, carried out on citrated plasma or serum, is a first-line examination to steer diagnosis in the event of any suspicion of TMA. Techniques for measuring ADAMTS13 activity have evolved considerably since 1998, alongside the understanding of the physiology of VWF/ADAMTS13 [20]. The principle of all methods for measuring ADAMTS13 activity is based on the degradation of an exogenous native VWF substrate (*full-length*) or a synthetic 73-amino-acid peptide (VWF73) by ADAMTS13 in the test plasma, followed by detection of the VWF degradation products by electrophoretic methods, IRMA (*immunoradiometric assay*) and CBA (*collagen binding assay*) (first-generation tests) [20], fluorometric (FRET-S-VWF73, international reference method) and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) tests [20] (second-generation tests) [21, 22], or chemiluminescence (third-generation test) [23].

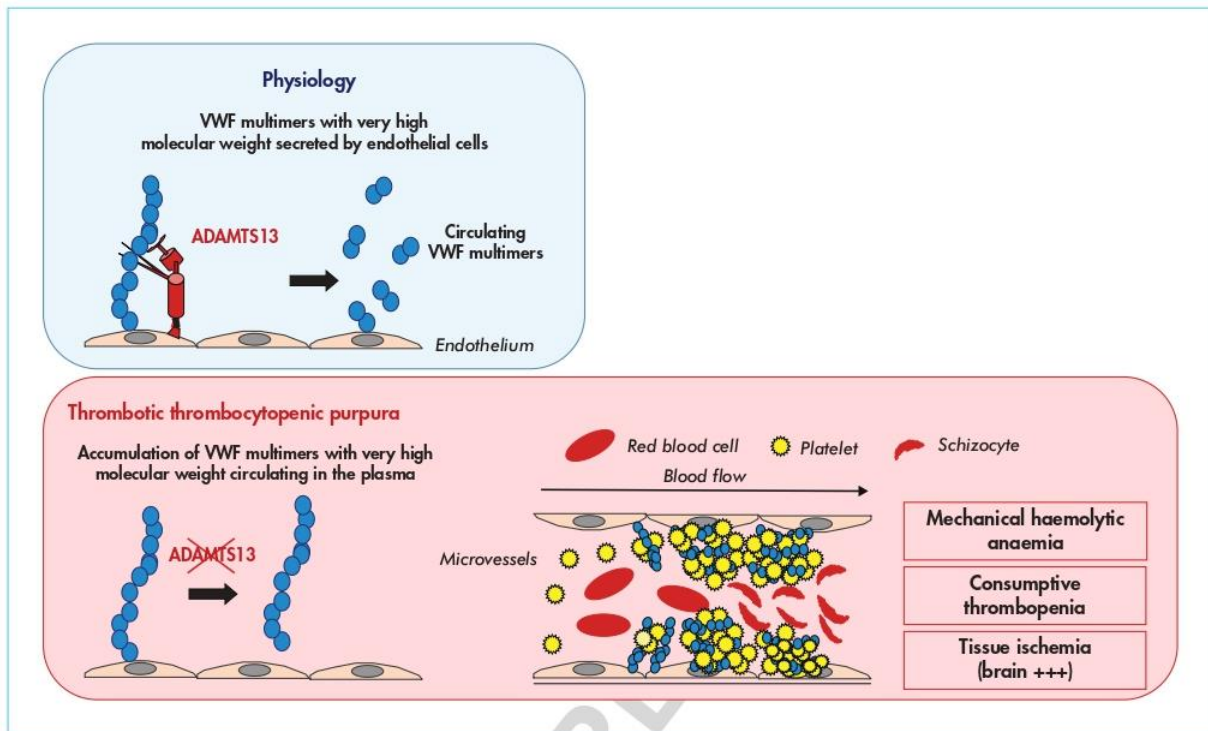
This latest third-generation test is fully automated, adaptable to emergency situations, and has very good diagnostic and analytical performance. It is, however, expensive [24].

Severe deficiency of ADAMTS13 activity (<10 IU/dL) confirms the diagnosis of TTP [12]. Anti-ADAMTS13 immunoglobulin G (IgG) testing and titration is the second test that should be performed for severe functional ADAMTS13 deficiency. If anti-ADAMTS13 IgG is positive, the diagnosis of iTTP is retained. In the absence of anti-ADAMTS13 IgG, biological monitoring is recommended to make the diagnosis of aTTP retrospectively, in the presence of detectable ADAMTS13 activity in remission. In the absence of anti-ADAMTS13 IgG, and depending on the clinical context (newborn, child, obstetrical context, *etc.*), sequencing of the ADAMTS13 gene is proposed in order to search for the presence of biallelic mutations of this gene, supporting the diagnosis of cTTP (*figure 4*).





FIGURE 2



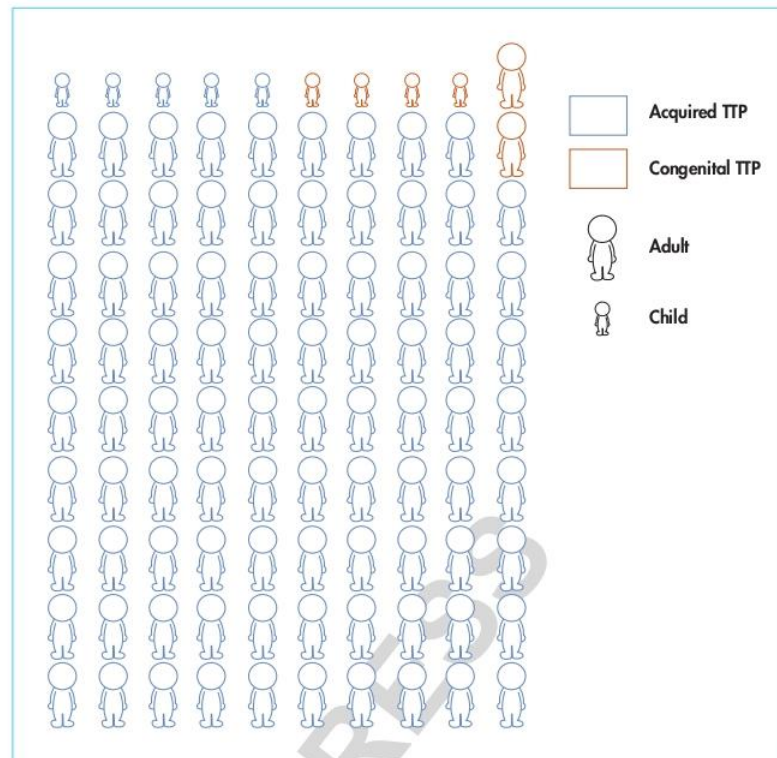
Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. Severe functional deficiency of ADAMTS13 (activity < 10 IU/dL) results in a defect of Von Willebrand factor (VWF) proteolysis and accumulation of very high-molecular-weight, hyperadhesive VWF multimers and spontaneous platelet thrombi in the microcirculation. This causes consumptive thrombocytopenia, fragmentation of red blood cells on the surface of microthrombi (mechanical haemolytic anaemia, schistocytes, consumptive thrombocytopenia) and a defect in tissue perfusion (multivisceral ischaemia).

It should be noted that the time it takes to receive the ADAMTS13 results should not delay treatment. The sample for ADAMTS13 investigation must be taken before the implementation of plasma replacement therapy (exogenous contribution of ADAMTS13, *see below*), and diagnostic confirmation of TTP can then be made retrospectively, within a few days.

### Latest advances in the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura

In iTTP, recent work has shown that there is a breakdown in immune tolerance resulting in the appearance of anti-ADAMTS13 autoantibodies responsible for a functional blockage or acceleration of ADAMTS13 clearance via the formation of immune complexes that are rapidly eliminated [11, 14]. Autoantibodies to ADAMTS13 are predominantly IgG, but IgM or IgA isotype antibodies have been described in 20% of patients. IgG autoantibodies are polyclonal but are predominantly directed against the spacer domain of ADAMTS13 corresponding to the binding site with the A2 domain of VWF (*figure 4*). Among the anti-ADAMTS13 IgG, the IgG4 subclass predominates, followed by IgG1, IgG2 and IgG3. The distinction of IgG isotypes and subclasses has prognostic value in the disease. The presence of IgA and/or IgG1 in the initial phase of TTP is associated with a poor prognosis, and a high level of IgG4 is thought to be associated with a high risk of relapse [13]. Several studies dedicated to mapping the spacer domain of ADAMTS13 in iTTP have shown that five positively charged residues (Arg568,

FIGURE 3



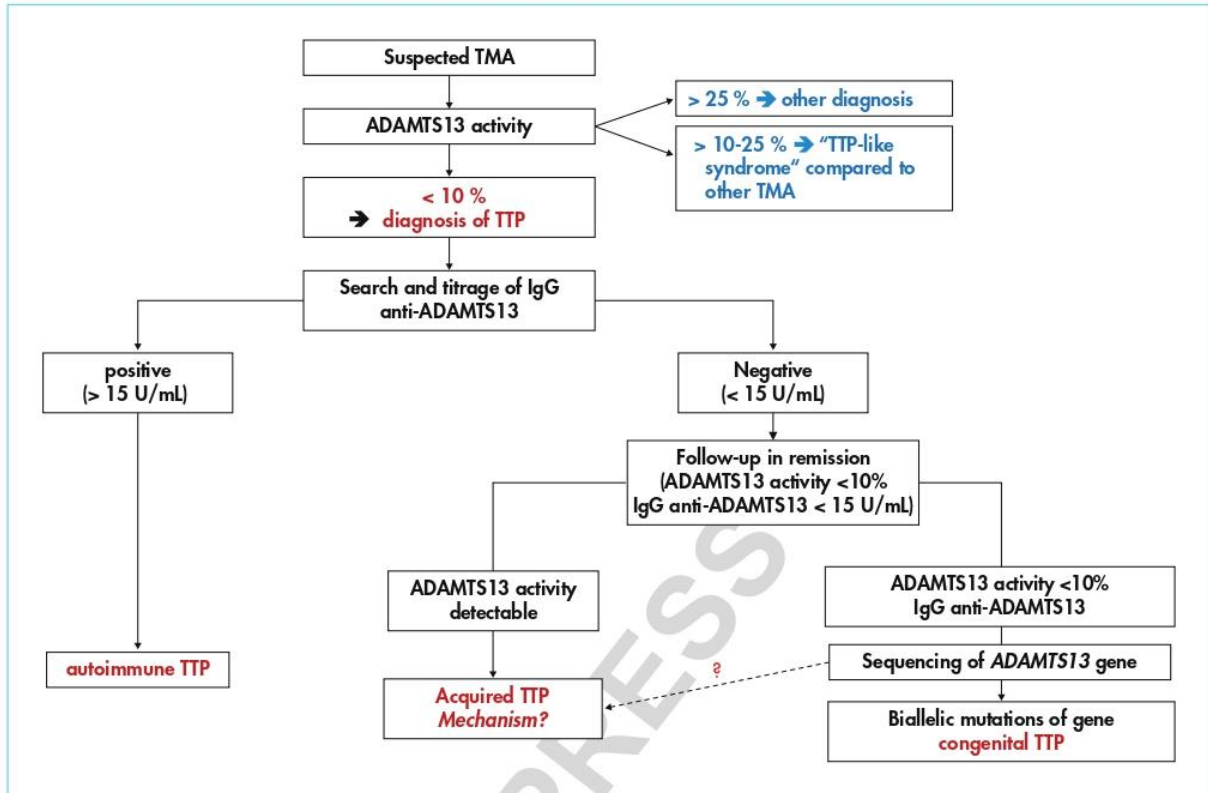
Distribution of 100 cases of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) according to age at onset and mechanism of severe ADAMTS13 deficiency. The first attack of TTP can occur in adults (>90 of 100 cases) or, more rarely, in children. Severe functional ADAMTS13 deficiency can be acquired (>95 of 100 cases, mainly with anti-ADAMTS13 autoantibodies) or is rarely congenital (biallelic mutations of the ADAMTS13 gene).

Arg660, Phe592, Tyr661, and Tyr665) constitute the major antigenic surface of anti-ADAMTS13 [7]. When the ADAMTS13 protease adopts a closed conformation, these residues are hidden by the CUB domains. In iTTP, ADAMTS13 adopts a specifically open conformation in the acute phase [25] allowing exposure of the cryptic domain of the spacer domain, which becomes the main target of anti-ADAMTS13 [26]. However, the mechanisms involved in the loss of autotolerance to ADAMTS13 are not well understood. There are predisposing factors for TTP (female, African or Caribbean patients, HLA DRB1\*11) and triggering factors (pregnancy, infection and inflammation) [13].

In cTTP, nearly 200 distinct mutations in the ADAMTS13 gene have been described, including nucleotide substitutions (62%), nonsense mutations (12.5%), splicing mutations (8%), deletions or insertions (17.5%), located along the entire length of the gene, with no *hot-spot* mutations. Two mutations are highly represented: the c.4143\_4144dupA duplication in exon 29 described in Central and Northern European families (prevalence: 0.04–0.33%) and the c.3178C > T substitution (p.Arg1060Trp) in exon 24, reported in adult-onset cTTP in the obstetrical setting (prevalence: 0.3–1 %). Several polymorphisms of ADAMTS13 can influence the penetrance of certain mutations (p.Arg7Trp, p.Gln448Glu, p.Pro618Ala, p.Ala732Val, p.Ala900Val, and p.Ala1033Thr). Correlations between phenotype and genotype are difficult to establish, given the high level of heterogeneity of ADAMTS13 [17].



FIGURE 4



Decision tree for the investigation of ADAMTS13. The measurement of ADAMTS13 activity in citrated plasma or serum is indicated as a first-line step for any suspicion of thrombotic microangiopathy (TMA) in the acute phase (a sensitive and specific parameter for the diagnosis of TTP), and in the biological follow-up of patients in remission (prognostic value for the risk of relapse). A severe functional ADAMTS13 deficiency (ADAMTS13 activity < 10 IU/dL) confirms the diagnosis of TTP. Anti-ADAMTS13 IgG is titrated when ADAMTS13 activity is severely deficient, revealing the presence of autoantibodies against the protease. In clinical remission, detectable ADAMTS13 activity points to an acquired form of TTP; undetectable ADAMTS13 activity and the absence of anti-ADAMTS13 IgG points to a possible congenital form of TTP.

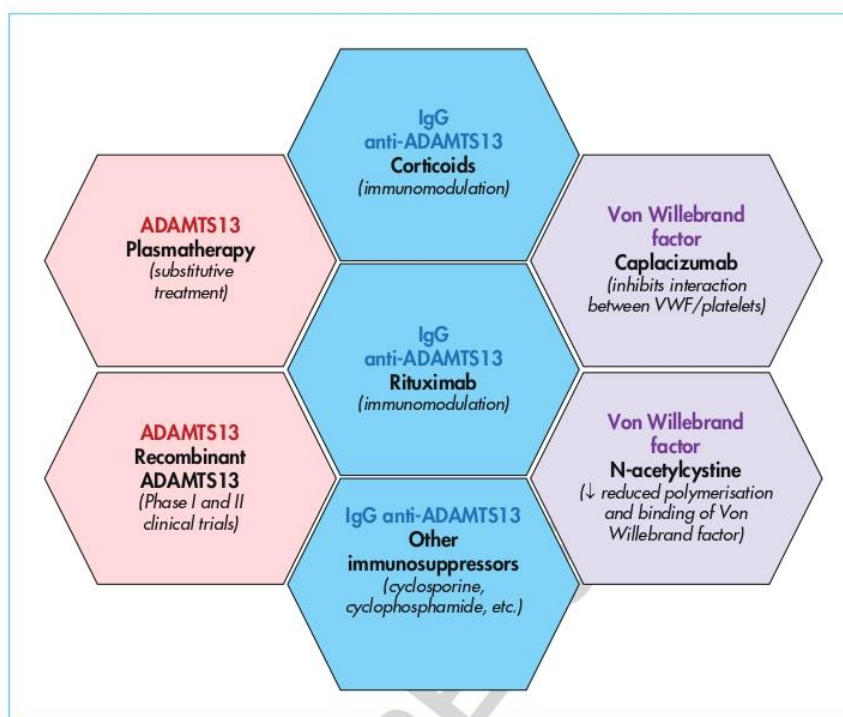
### Therapeutic targets in the management of thrombotic thrombocytopenic purpura (figure 5)

The therapeutic treatment of the acute phase of TTP is an emergency. The frequency of ischaemic organ failure should lead to hospitalisation in an intensive care unit. First-line treatment is based on plasma replacement therapy (plasma exchange [PE] or, failing that, fresh frozen plasma [FFP] infusions). Several therapeutic targets have been described in TTP: ADAMTS13 protease, anti-ADAMTS13 autoantibodies (immunomodulators) and VWF (inhibition of VWF/platelet interaction) [27].

Plasma replacement therapy provides exogenous ADAMTS13 (cleavage of high-molecular-weight VWF multimers and saturation of anti-ADAMTS13 autoantibodies in iTTP). PE may decrease the concentration of anti-ADAMTS13 autoantibodies, although the actual benefit of this effect has never been demonstrated. It is the first-line treatment for all iTTP and cTTP acute phases. In cTTP, prophylactic plasma therapy is the only treatment option available (10 mL/kg), and the frequency of plasma infusions is guided by the chronicity of the disease. The immunomodulatory treatments used in iTTP eradicate anti-ADAMTS13 autoantibodies.



FIGURE 5



Therapeutic targets in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Therapeutic targets in TTP include the ADAMTS13 protease, anti-ADAMTS13 autoantibodies and the VWF/platelet axis. Plasma exchange, plasma infusion and recombinant ADAMTS13 provide an exogenous supply of ADAMTS13. Corticosteroids, rituximab (an anti-CD20 drug) and other immunosuppressive drugs can eliminate anti-ADAMTS13 autoantibodies. Finally, caplacizumab and N-acetylcysteine limit the formation of platelet-rich and Willebrand factor-rich microthrombi.

Corticosteroids and rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) are currently used as first-line therapy in adults in the absence of contraindications, and always in combination with PE. Rituximab is not immediately effective (average delay of two weeks) and does not prevent early deaths, which most often occur within the first ten days of treatment [28]. Other immunosuppressive strategies (vincristine, cyclophosphamide and cyclosporine, or splenectomy) can be considered in refractory forms of iTTP but are used increasingly rarely since the use of caplacizumab. Caplacizumab is a bivalent humanised nanobody targeting the A1 domain of VWF and inhibiting its interaction with platelet GPIb. It is a molecule which received marketing authorisation in 2018 on the basis of the results of the two clinical trials, TITAN and HERCULES [29, 30]. Treatment with caplacizumab reduces time to normalisation of platelet count, mortality, exacerbations and early relapse of iTTP. The safety profile is very favourable, although some mucocutaneous bleeding, mostly minor or moderate, has been reported. A treatment regimen combining PE, caplacizumab and immunosuppression (corticosteroids and rituximab) prevents unfavourable outcomes in iTTP [31].

Another innovative therapy, recombinant ADAMTS13 (rADAMTS13), is emerging in the management of the disease. The results of the Phase I study of rADAMTS13 are encouraging and report good tolerance and efficacy of the treatment (decrease in high-molecular-weight VWF multimers, increase in platelet count and decrease in lactate dehydrogenases [LDH]) [32]. Two therapeutic trials dedicated to





rADAMTS13 are ongoing: a Phase III trial for cTTP (ClinicalTrials.gov, number NCT04683003) and a Phase II trial for aTTP (ClinicalTrials.gov, number NCT03922308).

N-acetylcysteine has mucolytic properties and may limit the polymerisation and binding of VWF multimers, however, due to its controversial efficacy - although minor compared to that of caplacizumab—it has recently been removed from the therapeutic arsenal [33].

It should be noted that transfusions of platelet concentrates are contraindicated in the absence of life-threatening bleeding symptoms, as they increase the formation of spontaneous platelet microthrombi.

### Patient follow-up

International guidelines for the diagnosis and treatment of the inaugural phase of TTP have been developed under the auspices of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) [23, 34]. Long-term follow-up of patients is crucial to anticipate any relapses, to detect ischaemic organ sequelae or the emergence of another autoimmune disease (mainly connective diseases), and to support a planned or ongoing pregnancy. Relapse prevention is a major issue in iTTP. In the French trial conducted by the National Reference Centre for Thrombotic Microangiopathies (CNR-MAT), the follow-up of patients who presented with an episode of iTTP is well defined (referential of the French Haematology Society). Long-term follow-up of all patients is recommended every three months for the first year after the inaugural episode of iTTP. Follow-up visits can be spaced at six months in the second year and then at one year if there are no intercurrent events. Regular monitoring, usually quarterly, of ADAMTS13 biological activity is recommended to assess the risk of biological relapse and to anticipate any further clinical relapse. This follow-up should probably be offered for life, as late relapses can occur, sometimes several years after the initial episode. During follow-up, it is reported that ADAMTS13 activity < 10 IU/dL is associated with a cumulative incidence of relapse at seven years of 74%. Pre-emptive treatment with rituximab is therefore proposed to the patient in the event of severe deficiency in ADAMTS13 activity in order to prevent the risk of clinical relapse. Women of childbearing age must be supported to carry future pregnancies to term and should be supervised and monitored by multidisciplinary teams. The transition from childhood to adulthood is also an important stage in the lives of patients. Systemic disease, typically systemic lupus erythematosus or Sjögren's syndrome, may develop during follow-up and should be investigated.

In cTTP, regular clinical and biological monitoring, as well as testing for anti-ADAMTS13 alloimmunisation, is recommended in all patients receiving regular prophylactic plasma therapy.

Caplacizumab is indicated for the management of adult and adolescent patients (>12 years and >40 kg) with an episode of iTTP in conjunction with PE and immunosuppressive therapy. Treatment with caplacizumab for at least 30 days after discontinuation of daily PE is recommended, possibly extended to a maximum of 65 days. This treatment is initiated in hospital and continued when the patient returns home. A hospital-based clinical research programme, called CAPLAVIE, conducted in France under the aegis of the National Reference Centre for Thrombotic Microangiopathies, is designed to address whether a treatment duration of caplacizumab adapted to ADAMTS13 activity is as effective as a minimum treatment duration of 30 days.

### Conclusion

Knowledge of the pathophysiology of TTP has evolved considerably over the last ten years. Investigation of the conformational change of ADAMTS13 in the acute

phase of iTTP may be an early biomarker of relapse risk. The study of epitope mapping of anti-ADAMTS13 antibodies may predict the prognosis of the disease. A growing number of promising new therapies are now available (caplacizumab) or in clinical trials for TTP (rADAMTS13), and TTP is now entering the era of personalised medicine.

**Conflicts of interest:** AV, YB and PC are members of the French expert committee on TTP for Sanofi. PC is a member of the international committee of experts on TTP for Takeda. ]

## References

- [1] Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015 ; 125 : 2019-28.
- [2] 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 : 4223-34.
- [3] Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996 ; 87 : 4235-44.
- [4] Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001 ; 413 : 488-94.
- [5] 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 ; 81 : 8-13.
- [6] 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 : 41059-63.
- [7] Roose E, Joly BS. Current and future perspectives on ADAMTS13 and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie* 2020 ; 40 (3) : 322-36.
- [8] Moschowitz E. Hyaline thrombosis of terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proc New York Pathol Soc* 1924 ; 24 : 21-4.
- [9] Moake JL, Rudy CK, Troll JH, et al. Unusually large plasma Factor VIII: Von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982 ; 307 : 1432-5.
- [10] Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998 ; 339 : 1578-84.
- [11] Tsai H-M, Lian EC. Antibodies to Von Willebrand factor-cleaving protease in acute TTP. *N Engl J Med* 1998 ; 339 : 1585-94.
- [12] Sadler JE. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2017 ; 130 : 1181-8.
- [13] Joly BS, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2017 ; 129 : 2836-46.
- [14] Mariotte E, Azoulay E, Galicier L, et al. Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol* 2016 ; 3 : 237-45.
- [15] Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M, et al. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2012 ; 119 : 5888-97.
- [16] Joly BS, Stepanian A, Leblanc T, et al. Child-onset and adolescent-onset acquired thrombotic thrombocytopenic purpura with severe ADAMTS13 deficiency: a cohort study of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol* 2016 ; 3026 : 1-10.
- [17] Joly BS, Boisseau P, Roose E, et al. ADAMTS13 gene mutations influence ADAMTS13 conformation and disease age-onset in the French cohort of Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Haemost* 2018 ; 118 : 1902-17.
- [18] Coppo P, Schwarzinger M, Buffet M, et al. Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience. *PLoS One* 2010 ; 5 : e10208.
- [19] Bendapudi PK, Li A, Hamdan A, et al. Derivation and prospective validation of a predictive score for the rapid diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura: the plasmic score. *Blood* 2014 ; 124 : 231-1231.
- [20] 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 ; 91 : 2839-46.
- [21] Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005 ; 129 : 93-100.
- [22] Joly BS, Stepanian A, Hajage D, et al. Evaluation of a chromogenic commercial assay using VWF-73 peptide for ADAMTS13 activity measurement. *Thromb Res* 2014 ; 134 : 1074-80.
- [23] Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, et al. ISTH guidelines for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 : 2496-502.
- [24] Beranger N, Benghezal S, Joly BS, et al. Diagnosis and follow-up of thrombotic thrombocytopenic purpura with an automated chemiluminescent ADAMTS13 activity immunoassay. *Res Pract Thromb Haemost* 2021 ; 5 : 81-93.
- [25] Roose E, Schelpe AS, Joly BS, et al. An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2018 ; 16 : 378-88.
- [26] Roose E, Schelpe AS, Tellier E, et al. Open ADAMTS13, induced by antibodies, is a biomarker for subclinical immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2020 ; 136 : 353-61.
- [27] Joly BS, Vanhoorelbeke K, Veyradier A. Understanding therapeutic targets in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Intensive Care Med* 2017 ; 43 : 1398-400.
- [28] Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, et al. Good practice statements (GPS) for the clinical care of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 : 2503-12.
- [29] Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, et al. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2016 ; 374 : 511-22.
- [30] Scully M, Cataland SR, Peyvandi F, et al. Caplacizumab treatment for acquired



thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2019 ; 380 : 335-46.

[31] Coppo P, Bubenheim M, Azoulay E, et al. A regimen with caplacizumab, immunosuppression, and plasma exchange prevents unfavorable outcomes in immune-mediated TTP. *Blood* 2021 ; 137 : 733-42.

[32] Scully M, Knöbl P, Kentouche K, et al. Recombinant ADAMTS-13: first-in-human pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2017 ; 130 : 2055-64.

[33] Tersteeg C, Roodt J, Van Rensburg WJ, et al. N-acetylcysteine in preclinical mouse

and baboon models of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2017 ; 129 : 1030-8.

[34] Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, et al. ISTH guidelines for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2020 ; 18 : 2496-502.

IN PRESS



## von Willebrand factor/ADAMTS13 axis and venous thromboembolism in moderate-to-severe COVID-19 patients

Patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2)- have been reported to develop endothelium injury, an excessive inflammatory response and subsequent marked hypercoagulability, leading to a high

prevalence of venous thromboembolic events (VTE), up to c. 50% in severe cases.<sup>1,2</sup>

von Willebrand factor (VWF) is known as a major cause of thrombo-inflammation via mechanisms including

**Table I.** Clinical and laboratory parameters in 133 COVID-19 patients with and without venous thromboembolic events.

|   | Patients with VTE<br>(n = 38) | Patients without VTE<br>(n = 95) | P-value |
|---|-------------------------------|----------------------------------|---------|
| <b>Demographics and past medical history</b>              |                               |                                  |         |
| Age, years  | 63 [59–71]                    | 67 [54–77]                       | 0.36    |
| Female/Male sex, n  | 11/27 (30/70)                 | 25/70 (26/74)                    | 0.67    |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )                                  | 28.1 [24.9–31.0]              | 27.0 [24.0–31.0]                 | 0.62    |
| Diabetes  | 17 (46)                       | 40 (42)                          | 0.70    |
| Ischemic heart disease                                    | 7 (19)                        | 29 (3)                           | 0.28    |
| Autoimmune disease  | 4 (11)                        | 12 (13)                          | 1.0     |
| <b>Severity of disease and outcome</b>                    |                               |                                  |         |
| Critically ill patients                                   | 27 (73)                       | 41 (43)                          | 0.002   |
| Maximal oxygen flow (l/min) (n = 65)†                     | 7 [3–12]                      | 3 [2–9]                          | 0.09    |
| PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg) (n = 68)*       | 172 [113–231]                 | 112 [81–162]                     | 0.04    |
| Death   | 9 (24)                        | 14 (15)                          | 0.21    |
| <b>Laboratory parameters (reference interval)</b>         |                               |                                  |         |
| Leukocytes (G/l) (4.0–10.0)                               | 9.4 [8.0–13.7]                | 7.7 [5.4–10.6]                   | 0.006   |
| Haemoglobin (g/dl) (males, 13.0–17.0; females, 12.0–16.0) | 10.6 [9.3–11.8]               | 11.9 [10.4–13.0]                 | 0.002   |
| Platelets (G/l) (150–450)                                 | 291 [185–375]                 | 302 [206–374]                    | 0.70    |
| Prothrombin time (ratio) (0.8–1.20)                       | 1.1 [1.1–1.2]                 | 1.1 [1.0–1.2]                    | 0.07    |
| D-dimer (ng/ml) (<500)                                    | 6,010 [3,022–13,752]          | 1,630 [800–2,980]                | <0.0001 |
| Serum creatinine (μmol/l) (64–104)                        | 86 [60–129]                   | 79 [62–119]                      | 0.34    |
| LDH (IU/l) (125–220)                                      | 521 [451–739]                 | 423 [302–547]                    | 0.0003  |
| Bilirubin (μmol/l) (5–20)                                 | 12.5 [4.6–14.5]               | 11.0 [8.0–16.0]                  | 0.17    |
| Haptoglobin (g/l) (0.4–2.68)                              | 3.35 [2.75–3.98]              | 3.23 [1.74–3.98]                 | 0.45    |
| AST (IU/l) (<34)  | 58 [44–104]                   | 51 [36–68]                       | 0.05    |
| ALT (IU/l) (0–55)   | 37 [24–54]                    | 32 [21–49]                       | 0.31    |
| ADAMTS13 activity (IU/dl) (50–150)                        | 59.0 [38.8–70.5]              | 68.5 [52.0–87.5]                 | 0.005   |
| VWF:Ag (IU/dl) (50–150)                                   | 522 [411–672]                 | 473 [311–589]                    | 0.05    |
| Factor VIII (IU/dl) (50–150)‡                             | 265 [216–339]                 | 258 [180–336]                    | 0.80    |
| Fibrinogen (g/l) (2.0–4.0)                                | 7.07 [5.51–8.50]              | 6.81 [5.47–8.35]                 | 0.54    |
| C-reactive protein (mg/l) (≤5)                            | 127 [55–216]                  | 91 [53–281]                      | 0.40    |
| Procalcitonin (μg/l) (<0.05)                              | 0.50 [0.16–1.00]              | 0.25 [0.07–0.55]                 | 0.04    |
| Interleukin-6 (pg/ml) (<7)                                | 102 [30–138]                  | 66 [23–140]                      | 0.49    |

ADAMTS13, a-disintegrin-like-metalloprotease-with-a-thrombospondin-type-1-motif-member 13; ALT, serum alanine aminotransferase; AST, serum aspartate aminotransferase; LDH, serum lactate dehydrogenase; VWF:Ag, von Willebrand factor antigen; VTE, venous thromboembolism.

Values are median [25th–75th centiles] or n (%).

\*Measured in intensive care unit patients.

†Measured in medical ward patients.

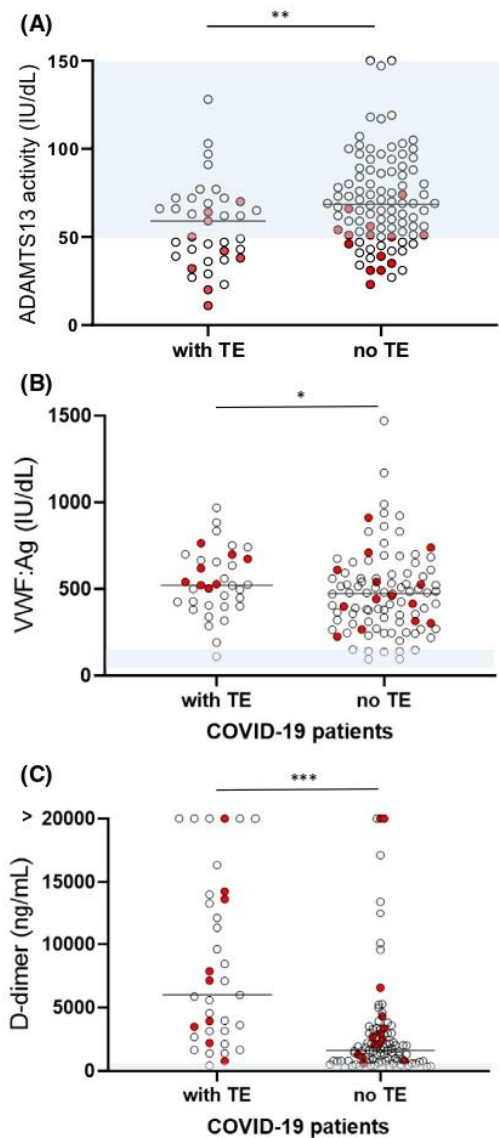
‡Factor VIII levels systematically measured at three dilutions may have been underestimated due to the high prevalence of lupus anticoagulant in COVID-19 patients.

endothelial activation, enhanced VWF secretion, assembly of hyper adhesive VWF multimers, defective VWF cleavage by its specific protease a-disintegrin-like-metalloprotease-with-a-thrombospondin-type-1-motif-member 13 (ADAMTS13) and adhesion/deposition of VWF-platelet thrombi in the vasculature.<sup>2,3</sup> Platelet or ultra large VWF multimer complexes have been shown to promote pulmonary vascular microthrombosis, contributing to respiratory failure.<sup>4</sup> Interestingly, previous studies have shown the involvement of the VWF/ADAMTS13 axis in the pathological the VTE process,<sup>3,5</sup> thus supporting the view that imbalance in this axis may lead to subsequent thrombi, in both small and large vessels.<sup>4</sup>

Surprisingly, the VWF/ADAMTS13 axis has been poorly investigated in coronavirus disease-2019 (COVID-19) patients. Only limited series with up to 88 patients have been published.<sup>6–12</sup> Therefore, we conducted an exploratory study in moderate-to-severe COVID-19 patients managed in hospital to analyse the implication of the VWF/ADAMTS13 axis in VTE (i.e., deep venous thrombosis (DVT) or pulmonary embolisms (PE)).

### Patients and methods

We conducted a single-centre, prospective study including all consecutive COVID-19 adult patients admitted from 17 March 2020 to 11 April 2020 to our intensive care unit (referred as ‘critically ill patients’) and medicine ward (referred as ‘non-critically ill patients’). This study was part of the ICU-COVID and French-COVID cohort registries approved by our institutional ethics committee (IDRCB 2020-A00256-33; CPP 11-202020.02.04.68737). SARS-CoV-2 infection was diagnosed on admission using reverse transcription-polymerase chain reaction (Cobas-SARS-CoV-2 Kits, Roche, France). To diagnose lower extremity DVT, duplex ultrasound was performed weekly in critically ill patients<sup>13</sup> and upon clinical suspicion in non-critically ill patients. If suspected, PE was confirmed using computed-tomography/angiography. Laboratory parameters were measured within 48 h post-admission. Regarding patients transferred from the medical ward to the intensive care unit (ICU), only data from ICU blood sampling was included in the analysis and those patients were considered as critically ill. ADAMTS13 activity was measured using an in-house fluorescence resonance energy transfer (FRET)-VWF73 assay with the recombinant VWF73 peptide (Peptide Institute, Osaka, Japan).<sup>14</sup> VWF antigen (VWF:Ag) was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (Asserachrom®, Stago, France). Quantitative variables are expressed as medians (25th–75th centiles) and categorical variables as percentages. Pearson’s correlation tests were used to assess the relationships between quantitative parameters. Comparisons were performed using Mann-Whitney *U* and Fisher’s exact tests, as appropriate. *P*-values <0.05 were considered significant.



**Fig 1.** (A) a-disintegrin-like-metalloprotease-with-a-thrombospondin-type-1-motif-member 13 (ADAMTS13) activity. (B) von Willebrand factor antigen and (C) D-dimer in COVID-19 patients with and without thrombotic events (TE). Comparisons were performed using Mann-Whitney *U* tests. \**P* = 0.05, \*\**P* = 0.005, \*\*\**P* < 0.0001. White circles represent survivors and red circles represent non-survivors. Continuous lines represent median values. Pale blue squares represent reference ranges. ADAMTS13 activity was significantly lower and D-dimer significantly higher in non-survivors versus survivors (*P* < 0.0001 and *P* = 0.03 respectively). The lowest ADAMTS13 activity we measured (11 IU/dl) was found in a 70-year old female (A) lowest red circle in the group ‘with TE’, she presented with mild thrombocytopenia (130 G/l) and severe anaemia without schistocytes. She died five days after admission due to hospital-acquired pulmonary bacterial superinfection associated with acute kidney injury and psoas hematoma. [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]



## Results

One-hundred-and-thirty-three consecutive COVID-19 patients (median age 65 years [56–75]; male/female ratio, 2.7), including 68 critically ill and 65 non-critically ill, were recruited. Clinical and laboratory parameters are summarised in Table I. Overall, VTE occurred in 38 patients including isolated DVT in 24 patients (63%; 13 distal and 11 proximal), isolated PE in nine patients (24%) and both PE/DVT in five patients (13%).

D-Dimer was significantly higher [6010 ng/ml (3022–13 752) vs. 1630 ng/ml (800–2980),  $P < 0.0001$ ], whereas ADAMTS13 activity was significantly lower in VTE versus non-VTE patients [59.0 IU/l (38.8–70.5) vs. 68.5 IU/l (52.0–87.5),  $P = 0.005$ ] Fig 1. This association remained significant in both the ICU [50.0 (37.5–69.5) vs. 62.5 (49.3–74.0),  $P < 0.001$ ] and medical ward patients [63.0 (44.0–74.3) vs. 74.0 (55.5–94.5),  $P = 0.002$ ]. Eighteen VTE patients (47%) vs. 17 non-VTE patients (18%) had ADAMTS13 activity below the normal range (50–150 IU/dl). Noteworthy, none of the patients exhibited ADAMTS13 activity of  $< 10$  IU/dl, thus excluding a thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) diagnosis. All patients had strikingly high VWF:Ag levels that were significantly higher in VTE versus non-VTE [522 IU/dl (411–672) vs. 473 IU/dl (311–589) respectively,  $P = 0.05$ ].

Death occurred in 23 patients (17%). D-Dimer was significantly higher [3370 ng/ml (2090–7515) vs. 1900 ng/ml (890–3890),  $P = 0.03$ ], whereas ADAMTS13 activity was significantly lower [50.0 IU/dl (32.8–55.5) vs. 69.0 IU/dl (53.0–88.0),  $P < 0.0001$ ] in non-survivors versus survivors Fig 1. No association was observed between death and VWF:Ag level.

We found negative but weak relationships with substantial inter-individual variability between ADAMTS13 activity and D-Dimer ( $r = -0.272$ ,  $P = 0.006$ ) as well as ADAMTS13 activity and VWF:Ag levels ( $r = -0.183$ ,  $P = 0.04$ ).

## Discussion

In this exploratory study, we demonstrated that ADAMTS13 activity and VWF:Ag levels were significantly associated with VTE onset. Moreover, ADAMTS13 activity was significantly associated with survival.

In SARS-CoV and Middle East respiratory syndrome-coronavirus (MERS-CoV) infections, endotheliopathy-associated vascular microthrombotic disease has been described.<sup>4</sup> SARS-CoV-2 is known to provoke an excessive local and systemic inflammatory response-denominated cytokine storm in the most severe cases.<sup>1</sup> Microthrombi and thrombi were also reported in COVID-19-related lung histopathological findings in addition to diffuse alveolar damage and inflammatory changes.<sup>15</sup> Interestingly, VWF expression was shown to be more important in the endothelial cells of lung small vessels with upregulated transcription, under hypoxic conditions.<sup>3</sup> Moreover, VWF/ADAMTS13 axis involvement in thrombi formation in microcirculation was established, as illustrated

in TTP.<sup>3</sup> Together, these observations suggest a potential role of VWF/ADAMTS13 in COVID-19.

In our patients, we found a markedly imbalanced VWF/ADAMTS13 axis with extremely high circulating VWF concentrations up to 1470 IU/dl, contrasting with normal or decreased ADAMTS13 activities, partly due to consumption by its substrate VWF and/or inhibition by high interleukin-6 levels, as previously shown.<sup>3</sup> We, therefore, hypothesized that high D-Dimer and low ADAMTS13 activities may be related to microthrombosis in the respiratory system<sup>12</sup> and represent surrogate markers of death, as reported with ADAMTS13<sup>11</sup> or D-Dimer in COVID-19<sup>16</sup> and VWF in early acute lung injury.<sup>17</sup> Of note, we did not observe TTP, in agreement with other reports (Table S1).

Increasing evidence supports the view that inflammation can cause thrombosis in large vessels mediated by VWF.<sup>3</sup> In COVID-19, specific pathways promoting clot formation have been suggested involving SARS-CoV-2 binding to angiotensin-converting enzyme-2 with subsequent angiotensin-2 accumulation, vasoconstriction and VWF release from endothelial cells.<sup>2</sup> Our findings linking VWF and ADAMTS13 to VTE support such hypotheses.

Our study has limitations including the single-centre setting and the short study period. DVT was not systematically screened in non-critically ill patients, underestimating its prevalence in this group.

To conclude, our data highlights the role of the VWF/ADAMTS13 axis at the crossroads between lung system microthrombosis and venous macrothrombosis in COVID-19.

## Author contributions

VS, BM and AS designed the study. MD, VS, MN, BJ, NB, BM and AS collected the data. MD, VS, BM and AS analysed the data. DS, BC, SV, PB and BM performed patient management. MD, VS, BM and AS wrote the first draft of the report. All authors read and approved the final manuscript.


## Acknowledgements

The authors thank Caren Brumpt for helpful data collecting and Agnès Veyradier for critical reading.

## Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interests.

Maxime Delrue<sup>1,2</sup>

Virginie Siguret<sup>1,3</sup> 

Marie Neuwirth<sup>1,3</sup>


Bérangère Joly<sup>1,2</sup>

Nicolas Beranger<sup>1,2</sup>

Damien Sène<sup>4</sup>

Benjamin G. Chousterman<sup>5,6</sup>

Sebastian Voicu<sup>7,8</sup>

Philippe Bonnin<sup>9,10,11</sup>Bruno Mégarbane<sup>7,8</sup>Alain Stéphanian<sup>1,2</sup> <sup>1</sup>Department of Hematology, Lariboisière Hospital, Paris University,<sup>2</sup>EA 3518, Paris University, <sup>3</sup>INSERM, UMRS 1140, Paris University,<sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Lariboisière Hospital, Paris University,<sup>5</sup>Department of Anesthesiology and Critical Care, LariboisièreHospital, Paris University, <sup>6</sup>INSERM, UMRS 942, Université de Paris,<sup>7</sup>Department of Medical and Toxicological Critical Care, LariboisièreHospital, Paris University, <sup>8</sup>INSERM, UMRS 1144, Paris University,<sup>9</sup>Department of Clinical Physiology, Lariboisière Hospital, Paris University,<sup>10</sup>INSERM U1265, INSERM, Université de Paris and <sup>11</sup>INSERM

U1148-Laboratory for Vascular and Translational Science, Université

de Paris, Paris, France.

E-mail: alain.stephanian@aphp.fr

**Keywords:** ADAMTS13, COVID-19, venous thrombosis, von Willebrand factor

First published online 24 December 2020

doi: 10.1111/bjh.17216

### Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Table SI.** Summary of case-series reporting ADAMTS13/VWF axis results in COVID-19 patients.

### References

- Joly BS, Siguret V, Veyradier A. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Med.* 2020;**46**(8):1603–6.
- Iba T, Levy JH, Connors JM, Warkentin TE, Thachil J, Levi M. The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. *Critical care (London, England).* 2020;**24**(1):360.
- Chen J, Chung DW. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13. *Blood.* 2018;**132**(2):141–7.
- Chang JC. Acute respiratory distress syndrome as an organ phenotype of vascular microthrombotic disease: based on hemostatic theory and endothelial molecular pathogenesis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2019;**25**:1076029619887437.
- Calabrò P, Gragnano F, Golia E, Grove EL. von Willebrand factor and venous thromboembolism: pathogenic link and therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost.* 2018;**44**(3):249–60.
- Escher R, Breakey N, Lämmle B. ADAMTS13 activity, von Willebrand factor, factor VIII and D-dimers in COVID-19 inpatients. *Thromb Res.* 2020;**192**:174–5.
- Morici N, Bottiroli M, Fumagalli R, Marini C, Cattaneo M. Role of von Willebrand Factor and ADAMTS-13 in the pathogenesis of thrombi in SARS-CoV-2 infection: time to rethink. *Thromb Haemost.* 2020;**120**(09):1339–42. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1713400>
- Huisman A, Beun R, Sikma M, Westerink J, Kusadasi N. Involvement of ADAMTS13 and von Willebrand factor in thromboembolic events in patients infected with SARS-CoV-2. *Int J Lab Hematol.* 2020;**42**(5). <https://doi.org/10.1111/ijlh.13244>
- Blasi A, von Meijenfeldt FA, Adelmeijer J, Calvo A, Ibañez C, Perdomo J, et al. In vitro hypercoagulability and ongoing in vivo activation of coagulation and fibrinolysis in COVID-19 patients on anticoagulation. *J Thromb Haemost.* 2020;**18**(10):2646–53. <https://doi.org/10.1111/jth.15043>
- Martinelli N, Montagnana M, Pizzolo F, Friso S, Salvagno GL, Forni GL, et al. A relative ADAMTS13 deficiency supports the presence of a secondary microangiopathy in COVID 19. *Thromb Res.* 2020;**193**:170–2.
- Bazzan M, Montaruli B, Sciascia S, Cosseddu D, Norbiato C, Roccatello D. Low ADAMTS 13 plasma levels are predictors of mortality in COVID-19 patients. *Intern Emerg Med.* 2020;**15**(5):861–3.
- Katmeni UK, Alexaki A, Hunt RC, Schiller T, DiCuccio M, Buehler PW, et al. Coagulopathy and thrombosis as a result of severe COVID-19 infection: a microvascular focus. *Thromb Haemost.* 2020. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715841>
- Voicu S, Bonnin P, Stéphanian A, Chousterman BG, Le Gall A, Malissin I, et al. High prevalence of deep vein thrombosis in mechanically ventilated COVID-19 patients. *J Am Coll Cardiol.* 2020;**76**(4):480–2. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.05.053>
- Mariotte E, Azoulay E, Galicier L, Rondeau E, Zouiti F, Boisseau P, et al. Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol.* 2016;**3**(5):e237–e245.
- Vasquez-Bonilla WO, Orozco R, Argueta V, Sierra M, Zambrano LI, Muñoz-Lara F, et al. A review of the main histopathological findings in the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Hum Pathol.* 2020. S0046–8177(20):30147–7. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2020.07.023>
- Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2020;**18**(4):844–7.
- Ware LB, Conner ER, Matthay MA. von Willebrand factor antigen is an independent marker of poor outcome in patients with early acute lung injury. *Crit Care Med.* 2001;**29**(12):2325–31.

## Convalescent plasma treatment of persistent severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) infection in patients with lymphoma with impaired humoral immunity and lack of neutralising antibodies

Since the first outbreak in Hubei, China in December 2019, severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) has rapidly spread across the globe. The broadly

prescribed anti-CD20 monoclonal antibody rituximab induces B-cell depletion and may affect anti-viral immunity, including the development of SARS-CoV-2 antibodies, risk



## BRIEF REPORT

# Imbalance of von Willebrand factor and ADAMTS13 axis is rather a biomarker of strong inflammation and endothelial damage than a cause of thrombotic process in critically ill COVID-19 patients

Bérangère S. Joly<sup>1,2</sup> | Michael Darmon<sup>3</sup> | Charlotte Dekimpe<sup>4</sup> | Thibault Dupont<sup>3</sup> | Guillaume Dumas<sup>3</sup> | Elise Yvin<sup>3</sup> | Nicolas Beranger<sup>1,2</sup> | Karen Vanhoorelbeke<sup>4</sup> | Elie Azoulay<sup>3</sup> | Agnès Veyradier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Service d'Hématologie biologique, Hôpital Lariboisière, AP-HP.Nord, Université de Paris, Paris, France

<sup>2</sup>EA3518 Institut de Recherche Saint-Louis, Université de Paris, Paris, France

<sup>3</sup>Service de Réanimation médicale, Hôpital Saint-Louis, AP-HP.Nord, Université de Paris, Paris, France

<sup>4</sup>Laboratory for Thrombosis Research, IRF Life Sciences, KU Leuven Campus Kulak, Kortrijk, Belgium

## Correspondence

Agnès Veyradier, Service d'Hématologie biologique, Hôpital Lariboisière, 2, rue Ambroise Paré, 75010 Paris, France.  
Email: agnes.veyradier@aphp.fr

## Funding information

KU Leuven

## Abstract

**Background:** Critically ill patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) are prone to developing macrothrombosis and microthrombosis. COVID-19 has been reported to be rarely associated with thrombotic microangiopathies. A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats, member 13 (ADAMTS13) severe deficiency, the hallmark of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), induces the formation of platelet, unusually large von Willebrand factor (VWF) multimer microthrombi. In immune-mediated TTP, ADAMTS13 adopts specifically an open conformation. The VWF/ADAMTS13 couple may contribute to the microthrombi formation in pulmonary alveolar capillaries in COVID-19.

**Objective:** To investigate clinical features, hemostatic laboratory parameters, VWF/ADAMTS13 axis, and ADAMTS13 conformation in critically ill COVID-19 patients at admission.

**Methods:** Fifty three critically ill COVID-19 patients were enrolled between March 18 and May 9 2020 in a monocentric hospital.

**Results:** The median age was 59 years and the male-to-female ratio was 2.8/1. We reported seven pulmonary embolisms and 15 deaths. Biological investigations showed increased fibrinogen and factor V levels, and strongly increased D-dimers correlated with mortality. No patient presented severe thrombocytopenia nor microangiopathic hemolytic anemia. An imbalance between high VWF antigen levels and normal or slightly decreased ADAMTS13 activity levels (strongly elevated VWF/ADAMTS13 ratio) was correlated with mortality. Three patients had a partial quantitative deficiency in ADAMTS13. We also reported a closed conformation of ADAMTS13 in all patients, reinforcing the specificity of an open conformation of ADAMTS13 as a hallmark of TTP.

Manuscript handled by: X. Long Zheng.

Final decision: Jill Johnsen and 01-Jul-2021.

© 2021 International Society on Thrombosis and Haemostasis

**Conclusion:** We suggest that slightly decreased or normal ADAMTS13 activity and highly elevated VWF are rather biomarkers reflecting both the strong inflammation and the endothelial damage rather than drivers of the thrombotic process of COVID-19.

**KEYWORDS**

ADAMTS13, ADAMTS13 conformation, COVID-19, thrombotic microangiopathy, von Willebrand factor

## 1 | INTRODUCTION

ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type I repeats, member 13) is the specific cleaving protease for von Willebrand factor (VWF), a multimeric glycoprotein released in blood from endothelial cells and that mediates platelet adhesion and aggregation.<sup>1</sup> Under physiological conditions, ADAMTS13 regulates the size of VWF multimers to prevent platelet-rich thrombi formation in the blood microvessels and it circulates in a closed conformation through a CUB-spacer (complement component C1r/C1s, Uegf, and bone morphogenic protein 1) domains interaction, which is temporarily disrupted upon binding to VWF.<sup>2</sup> The pathologic development of autoantibodies to ADAMTS13 induces a severe ADAMTS13 deficiency (activity <10 IU/dl), leading to the accumulation of ultralarge VWF multimers and subsequent systemic microvascular thrombosis that causes a specific thrombotic microangiopathy (TMA) named immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura (iTTP). Moreover, specifically in acute iTTP, ADAMTS13 adopts a sustained open conformation, likely mediated by ADAMTS13 autoantibodies.<sup>2,3</sup> In addition, bacterial and viral infections are triggers of TTP but their role on ADAMTS13 conformation is not known yet.

Interestingly, a high frequency of both macrovascular and microvascular thrombosis affecting lungs, kidneys, heart, and potentially complicated by multiorgan failure has been reported in prospective cohort studies led in critically ill patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19).<sup>4-6</sup> This novel coronavirus, termed severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), binds to angiotensin-converting enzyme 2, highly expressed in lung alveolar cells but also in the vascular endothelium.<sup>6</sup> The aggression of the endothelial host cells by SARS-CoV-2 explains both the endotheliopathy and the thromboinflammation processes supporting thrombotic microvascular events.<sup>6</sup>

Since 2020, to further understand the pathophysiology for SARS-CoV-2-related microthrombosis, several studies have focused on the VWF/ADAMTS13 axis in COVID-19 patients admitted on general wards and/or intensive care units (ICUs).<sup>7-12</sup> In summary, most results converge to an imbalance between VWF and ADAMTS13 showing markedly increased VWF antigen levels and VWF collagen-binding capacity but normal or slightly decreased ADAMTS13 activity,<sup>7-14</sup> resulting in the formation of large VWF multimers,<sup>15-18</sup> with the latter biomarkers sometimes correlating with mortality.<sup>9-12,15,17</sup> This VWF/ADAMTS13 imbalance may support the concept of a secondary TMA-like syndrome potentially present

### Essentials

- High frequency of macrovascular and microvascular thromboembolic events is reported in COVID-19.
- von Willebrand factor/ADAMTS13 ratio is strongly elevated and correlated to mortality in COVID-19.
- ADAMTS13 conformation is closed in severe COVID-19 in contrast to immune-mediated TTP.
- VWF and ADAMTS13 are biomarkers of endotheliopathy in COVID-19.

in some critically ill COVID-19 patients and contributing to the microthrombi formation in pulmonary alveolar capillaries.<sup>8,11,15,19</sup> Surprisingly, however, ~20 TTP cases likely triggered by a SARS-CoV-2 infection were recently reported.<sup>20-25</sup> Also, the link between a TMA process and the COVID-19-associated microthrombosis may be supported by the clinical improvement and the reduction of circulating thromboinflammatory markers (i.e., the VWF/ADAMTS13 ratio) induced by plasma exchange undertaken in some critically ill COVID-19 patients.<sup>15,26</sup> One *ex vivo* study suggested that purified recombinant ADAMTS13 should be considered as a potential therapy for COVID-19 patients.<sup>16</sup> To date however, no study has investigated ADAMTS13 conformation in COVID-19 patients, although infectious triggers are candidates to explain the initial disruption of the interaction between self-domains of ADAMTS13 leading to its switch from a folded to an open conformation.

In the current study, our major aim was thus to investigate hemostatic laboratory parameters and plasmatic ADAMTS13 features including ADAMTS13 conformation in critically ill COVID-19 patients at ICU admission.

## 2 | PATIENTS AND METHODS

### 2.1 | COVID-19 patients

The protocol was approved by the local institutional ethical committee. All consecutive patients admitted for acute respiratory distress syndrome (ARDS) by SARS-CoV-2 in the ICU of Saint-Louis hospital



(AP-HP, Paris, France) between March 18 and May 9, 2020, were enrolled.<sup>27</sup> Real-time quantitative PCR assay for SARS-CoV-2 RNA on nasopharyngeal swab specimens was positive in all patients. Clinical data and outcome were analyzed from medical records.

## 2.2 | Biological investigations

The following biological parameters were measured at admission: hemoglobin, platelet count, lactate dehydrogenase (LDH), fibrinogen, D-dimers, and factor V in the context of care.

Measurement of VWF antigen (VWF:Ag) and ADAMTS13 investigation were also performed on citrated plasma samples collected at admission and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use: VWF:Ag was measured with an ELISA (Asserachrom VWF:Ag), ADAMTS13 activity with FRET-S-VWF73 assay (Institute Inc), anti-ADAMTS13 IgG titration with ELISA (TECHNOZYM ADAMTS-13 INH, Technoclone), ADAMTS13 antigen with a homemade 3H9-ELISA,<sup>2,3</sup> and ADAMTS13 conformation with a homemade 1C4-ELISA, before and after incubation with the anti-CUB1 antibody 17G2 inducing an open conformation in ADAMTS13 (defined by a conformation index  $>0.5$ ).<sup>2,3</sup>

## 2.3 | Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as medians [25th, 75th percentiles] (minimum-maximum) and categorical variables as numbers and percentages. Comparisons were performed using Mann-Whitney and Fisher's exact tests, as appropriate, using GraphPad Prism v8.4.2 software (GraphPad Software). Any  $p$  values  $<0.05$  were considered significant.

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

Characteristics and outcome of the 53 patients enrolled are shown in Table 1. The median age at admission was 59 years [53, 66] and the male-to-female ratio was 39/14 (73.6% of men). Forty-three patients (81.1%) had at least one risk factor for cardiovascular disease such as overweight (body mass index: 25-29;  $n = 18$ , 34.0%) and obesity (body mass index  $\geq 30$ ,  $n = 16$ , 30.2%), dyslipidemia ( $n = 11$ , 20.7%), diabetes ( $n = 13$ , 24.5%), and hypertension ( $n = 24$ , 45.3%). The overall in-hospital mortality rate was 28.3% ( $n = 15$ ) and was higher in males ( $n = 13/39$ , 33%). Pulmonary embolism (PE) was diagnosed by computed tomography pulmonary angiography in seven patients (13.2%) with no history of thromboembolic event, a male-to-female ratio of 4/3, and associated with death in four cases (57% of patients with PE).

At ICU admission, three patients had a moderate thrombocytopenia over  $80 \times 10^9/\text{L}$  and 10 patients had an anemia with a hemoglobin level  $<10$  g/dl without hemolysis. No patient had clinical nor biological features of TMA syndrome (platelet counts:  $207 \times 10^9/\text{L}$  [168, 275]; hemoglobin levels: 11.9 g/dl [10.2, 13.3]). All patients presented elevated LDH levels (844 U/L [699, 939]) and a marked increase of fibrinogen

(6.68 g/L [5.87, 7.60];  $>8$  g/L in 9 patients [17%]), factor V (140% [118, 154];  $>120\%$  in 31 patients [59%]) and D-dimers (1120 ng/ml [770, 2840];  $>3000$  ng/ml in 13 patients [25%]) (Table 1).<sup>28</sup> Interestingly, nonsurvivor patients had significantly higher LDH, IL-6, and D-dimer concentrations when compared with survivor patients (LDH: 909 U/L [853, 1000] vs. 806 U/L [660, 870],  $p = 0.026$ ; IL-6: 113 pg/ml [79.8, 299.5] vs. 81 pg/ml [38.5, 109.0],  $p = 0.031$ ; D-dimers: 2310 ng/ml [1125, 3655] vs. 985 ng/ml [675, 2185],  $p = 0.018$ ) (Table 1). These results are the most consistent biological features with intense inflammatory response and hypercoagulability in COVID-19. However, no difference was reported when comparing PE with non-PE COVID-19 patients (data not shown). Our results, especially highly elevated D-dimer levels predictive of mortality, are in line with those previously reported in critically ill COVID-19 patients at admission.<sup>29</sup>

VWF:Ag levels were markedly increased in both survivor and nonsurvivor patients (326 [284, 378], vs. 416 IU/dl [355, 554], respectively) compatible with severe endothelial damage, but with borderline significant difference ( $p = 0.05$ ) (Table 1). In our 53 critically ill COVID-19 patients, ADAMTS13 activity ranged from 39 to 150 IU/dl (108 IU/dl [79, 132]), without detectable anti-ADAMTS13 IgG ( $<15$  U/ml in all patients), ADAMTS13 antigen ranged from 0.453 to 2.030  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (1.125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  [0.887, 1.269]), and only three patients (6%) had a partial quantitative deficiency in ADAMTS13 (both ADAMTS13 activity  $<50$  IU/dl [42, 39, and 39 IU/dl] and ADAMTS13 antigen  $<0.50$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ruling out TTP diagnosis (Figure 1). No significant difference of either VWF or ADAMTS13 was identified between patients with PE and those with no PE (data not shown). In contrast, interestingly, median ADAMTS13 activity was significantly lower in nonsurvivor patients when compared with survivor patients (85 vs. 115 IU/dl,  $p = 0.026$ ) (Figure 1). As a consequence, median VWF:Ag/ADAMTS13 activity ratio was strongly elevated in nonsurvivors (4.94 [3.13, 7.21] vs. 3.01 [2.47, 3.69],  $p = 0.025$ ) and was overall increased in the 53 patients (3.18 [2.59, 4.88], normal range 0.5-2). In contrast, ADAMTS13 antigen levels were not significantly different between survivors and nonsurvivors (1.127 vs. 1.020  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $p = 0.283$ ) (Figure 1). Our results suggested a consumption of the metalloprotease ADAMTS13 by its massively increased substrate, VWF, in line with strong inflammation and endothelial damage and/or a partial catalytic inhibition of ADAMTS13 by IL-6 and other cytokines released during the cytokine storm in severe COVID-19.<sup>30</sup>

Interestingly, in all 53 COVID-19 patients, ADAMTS13 was not captured by the monoclonal antispacer ADAMTS13 antibody 1C4, defining a closed conformation of ADAMTS13 (conformation index  $<0.5$ ). As expected, in a control experiment, addition of the monoclonal anti-CUB1 ADAMTS13 antibody 17G2 was able to induce an open conformation of ADAMTS13 *in vitro* in all 53 patients (Figure 2).

In this monocentric retrospective study, we confirm that SARS-CoV-2 infection leads to severe inflammatory response and hypercoagulability with markedly increased fibrinogen, factor V, D-dimers, and IL-6 levels in critically ill COVID-19 patients at ICU admission, with both latter biologic parameters correlating with mortality.<sup>9-12</sup> Endotheliitis lesions were highly suggested by increased VWF levels. Previous studies supported a potential link

TABLE 1 Characteristics of 53 critically ill COVID-19 patients at ICU admission

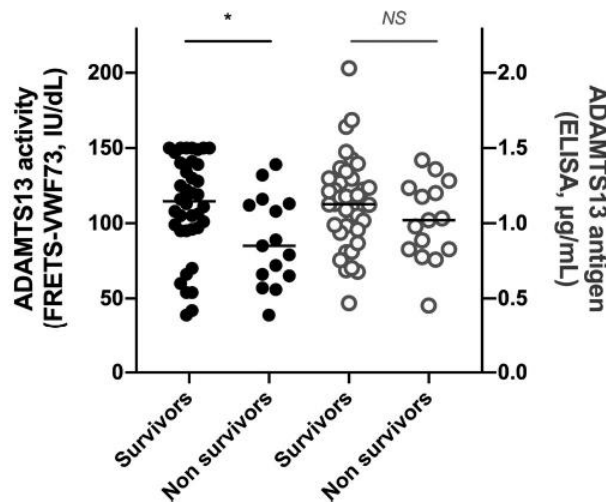
| Parameters                           | Methodology                                       | Reference Values | COVID-19 Patients (n = 53)      | Survivors (n = 38, 71.7%)     | Non-survivors (n = 15, 28.3%)     | P         |
|--------------------------------------|---|------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------|
| Age (y)                              | Medical records                                   |                  | 59 [53, 66] (29-76)             | 60 [50, 64] (29-76)           | 58 [56, 67] (49-70)               | 0.77      |
| Gender                               | Medical records                                   |                  | 14F / 39 M                      | 12F / 26 M                    | 2F / 13 M                         | 0.18      |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> )             | Medical records                                   | <25              | 28 [24, 31] (20-47)             | 28 [25, 32] (20-47)           | 28 [25, 29] (20-37)               | 0.66      |
| ≥2 cardiovascular risk factors       | Medical records                                   |                  | n = 22 (42%)                    | n = 15 (39%)                  | n = 7 (47%)                       | 0.63      |
| Pulmonary embolism                   | CTPA  |                  | n = 7 (13%)                     | n = 3 (8%)                    | n = 4 (27%)                       | 0.07      |
| Time of hospitalization (in days)    | Medical records                                   |                  | 196 [189, 202] (158-210)        | 197 [190, 202] (158-208)      | 193 [183, 203] (174-210)          | 0.56      |
| Hemoglobin (g/dl)                    | CBC (XN10, Sysmex)                                | ♂13-17<br>♀12-16 | 11.9 [10.2, 13.3] (5.9-16.3)    | 12.4 [10.8, 13.3] (5.9-16.3)  | 11.6 [10.0, 12.4] (6.1-14.6)      | 0.28      |
| Platelet count (x10 <sup>9</sup> /L) | CBC (XN10, Sysmex)                                | 150-450          | 207 [168, 275] (85-635)         | 214 [179, 275] (85-461)       | 183 [153, 286] (94-635)           | 0.26      |
| LDH (U/L)                            | Enzymatic (Roche Cobas)                           | 135-225          | 844 [699, 939] (380-1597)       | 806 [660, 870] (519-1597)     | 909 [853, 1000] (380-1420)        | 0.03 (p*) |
| IL-6 (pg/ml)                         | ECLIA (Roche Cobas)                               | <7               | 83.5 [40.5, 150.0] (3.3-2470.0) | 81.0 [38.5, 109.0] (3.3-319)  | 113.0 [79.8, 299.5] (14.5-2470.0) | 0.03 (p*) |
| Fibrinogen (g/L)                     | Chronometric (STA-FIB Liquid, Stago)              | 2-4              | 6.68 [5.87, 7.60] (3.92-10.47)  | 6.68 [5.96, 7.42] (3.92-9.47) | 6.70 [5.74, 7.98] (4.91-10.47)    | 0.72      |
| D-dimers (ng/ml)                     | Immunoturbidimetry (STA-Liatest D-Di Plus, Stago) | <500             | 1120 [770, 2840] (270-20000)    | 985 [675, 2185] (270-20000)   | 2310 [1125, 3655] (730-20000)     | 0.02 (p*) |
| Factor V (%)                         | Chronometric (STA-Deficient V, Stago)             | 70-120           | 140 [118, 154] (56-200)         | 141 [123, 158] (56-200)       | 127 [115, 145] (92-195)           | 0.21      |
| VWF antigen (IU/dl)                  | ELISA (Asserachrom VWF:Ag, Stago)                 | 50-150           | 354 [285, 429] (144-704)        | 326 [284, 378] (144-704)      | 416 [355, 554] (145-596)          | 0.05      |

Note: Quantitative variables are expressed as medians [25th, 75th percentiles], (min-max) and categorical variables as numbers and percentages.

Comparisons were performed using Mann-Whitney and Fisher's exact tests, as appropriate. *p*-values <0.05 were considered significant.

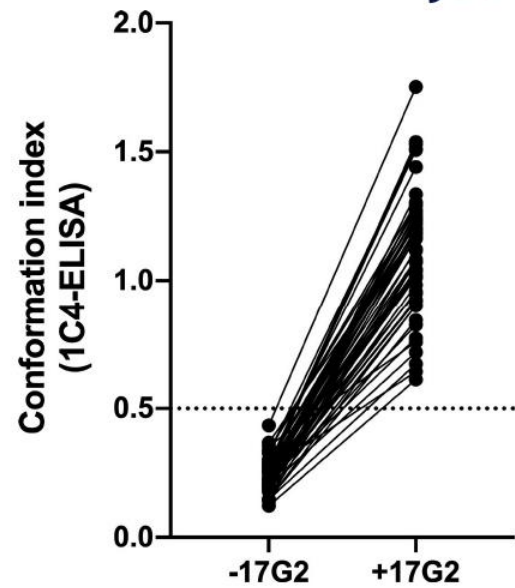
Abbreviations: BMI, body mass index; CBC, complete blood count; CTPA, computed tomography pulmonary angiography; ICU, intensive care unit; VWF, von Willebrand factor.





**FIGURE 1** ADAMTS13 activity and antigen in 53 critically ill COVID-19 patients at ICU admission. ADAMTS13 activity (black circle) and antigen (gray circle) were measured in 53 COVID-19 patients at admission, including 38 survivors and 15 nonsurvivors to their hospitalization. Comparisons were performed using Mann-Whitney.  $p$  values  $<0.05$  were considered significant. Median [25th, 75th percentiles] ADAMTS13 activity levels were 108 [79, 132] IU/dl in the total patients, 115 [96, 140] IU/dl in the survivors, and 85 [66, 113] IU/dl in the nonsurvivors, respectively. Median [25th, 75th percentiles] ADAMTS13 antigen levels were 1.125 [0.887, 1.269]  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the total patients, 1.127 [0.963, 1.289]  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the survivors, and 1.020 [0.828, 1.218]  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in the nonsurvivors, respectively. ADAMTS13 activity was significantly lower in nonsurvivor patients when compared with survivor patients ( $p = 0.026$ ), although no significant difference was observed for ADAMTS13 antigen between both groups

between severe COVID-19-related microthrombosis and secondary TMA-like syndrome enhanced by partial consumption and/or inhibition of ADAMTS13 by inflammatory cytokines as IL-6, in line with a process similar to that observed in sepsis.<sup>1,6</sup> In COVID-19, a phenomenon of thrombotic pulmonary capillaritis supporting ARDS could be partially explained by the unbalance between VWF and ADAMTS13 and play a crucial role in short-term prognosis.<sup>6-12</sup> In our group of 53 critically ill patients with COVID-19, both ADAMTS13 activity and the VWF:Ag/ADAMTS13:activity ratio were correlated to mortality, in agreement with other studies.<sup>7-12,15,17</sup> However, this result needs to be nuanced because ADAMTS13 activity remained in the normal or subnormal range, so it cannot support a strong thrombotic tendency in the pathogenesis of ARDS. Also, none of our patients exhibited diagnostic hallmarks of classic TMA because there is no severe thrombocytopenia or microangiopathic hemolytic anemia. Of course, our study may be limited by its monocentric and its ~8-week prospective enrollment. However, when considering our data combined with those of the recent literature, it seems more reasonable to think that both VWF and ADAMTS13 are biomarkers reflecting the severity of the endothelial disease caused by SARS-CoV-2 infection (and collateral prognosis biomarkers) rather than strong pathophysiologic actors of the microthrombotic



**FIGURE 2** ADAMTS13 conformation in 53 critically ill COVID-19 patients at ICU admission. Plasma samples of 53 COVID-19 patients at admission were added to wells coated with the anti-ADAMTS13 antibody 1C4 before and after incubation with the anti-CUB1 antibody 17G2 inducing an open conformation in ADAMTS13. If ADAMTS13 was not captured by 1C4, the conformation of ADAMTS13 is closed (conformation index  $\leq 0.5$ ). If ADAMTS13 was captured by 1C4, the conformation of ADAMTS13 is open (conformation index  $>0.5$ ). All patients exhibited a closed ADAMTS13 conformation, which was induced open after addition of the anti-CUB1 antibody 17G2

process of COVID-19-associated ARDS.<sup>31</sup> This interpretation is further supported by our main result showing that SARS-CoV-2 is not an infectious agent able to induce an open conformation of ADAMTS13, a biological feature that could be one of the triggers for the preliminary step to immune-mediated ADAMTS13 deficiency.<sup>2,3</sup> Altogether, our results also reinforce the specificity of an open conformation of ADAMTS13 as a hallmark of iTTP.<sup>2,3</sup>

In conclusion, COVID-19-associated TMA is likely mostly restricted to the pulmonary microcirculation. This study suggests that normal or slightly low ADAMTS13 activity and highly elevated VWF are rather biomarkers reflecting strong inflammation and endothelial damage rather than drivers of the thrombotic process reported in COVID-19. Further studies are definitely needed to consider the VWF/ADAMTS13 axis as a rational therapeutic option in severe COVID-19.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly funded by KU Leuven grant COVID19-Thrombosis in COVID19. We thank Sandrine Benghezal, Sophie Capdenat, Adeline Delton, and Sylvaine Savigny for expert technical assistance.

#### CONFLICT OF INTEREST

None of the authors has any conflict of interest to declare.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Bérangère S. Joly performed and supervised the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. Bérangère S. Joly and Michael Darmon performed the statistical analysis. Charlotte Dekimpe was highly involved in the ADAMTS13 conformation experiments, analyzed data, and critically reviewed the manuscript. Elie Azoulay, Michael Darmon, Thibault Dupont, Guillaume Dumas, and Elise Yvin enrolled the patients, provided the clinical data, and critically reviewed the manuscript. Nicolas Beranger performed some experiments and critically reviewed the manuscript. Karen Vanhoorelbeke, Elie Azoulay, and Agnès Veyradier supervised the study and critically reviewed the manuscript. All authors accepted the final version of the manuscript.

## REFERENCES







- Roose E, Joly BS. Current and future perspectives on ADAMTS13 and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie*. 2020;40:322-336.
- Roose E, Schelpe AS, Joly BS, et al. An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2018;16:378-388.
- Roose E, Schelpe A-S, Tellier E, et al. Open ADAMTS13, induced by antibodies, is a biomarker for subclinical immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2020;136:353-361.
- Helms J, Tacquard C, Severac F, et al. High risk of thrombosis in patients in severe SARS-CoV-2 infection: a multicenter prospective cohort study. *Intensive Care Med*. 2020;46:1089-1098.
- Joly BS, Siguret V, Veyradier A. Understanding pathophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Med*. 2020;46:1603-1606.
- Rovas A, Osiaevi I, Buscher K, et al. Microvascular dysfunction in COVID-19: the MYSTIC study. *Angiogenesis*. 2021;24:145-157.
- Escher R, Breakey N, Lämmle B. ADAMTS13 activity, von Willebrand factor, factor VIII and D-dimers in COVID-19 inpatients. *Thromb Res*. 2020;192:174-175.
- Martinelli N, Montagnana M, Pizzolo F, et al. A relative ADAMTS13 deficiency supports the presence of a secondary microangiopathy in COVID 19. *Thromb Res*. 2020;193:170-172.
- Morici N, Bottirollo M, Fumagalli R, Marini C, Cattaneo M. Role of von Willebrand factor and ADAMTS-13 in the pathogenesis of thrombi in SARS-CoV-2 infection: time to rethink. *Thromb Haemost*. 2020;120:1339-1342.
- Mancini I, Baronciani L, Artoni A, et al. The ADAMTS13-von Willebrand factor axis in COVID-19 patients. *J Thromb Haemost*. 2021;19:513-521.
- Henry BM, Benoit SW, Oliveira MHS, Lippi G, Favaloro EJ, Benoit JL. ADAMTS13 activity to von Willebrand factor antigen ratio predicts acute kidney injury in patients with COVID-19: evidence of SARS-CoV-2 induced secondary thrombotic microangiopathy. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2020;10. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13415>
- Philippe A, Chocron R, Gendron N, et al. Circulating von Willebrand factor and high molecular weight multimers as markers of endothelial injury predict COVID-19 in-hospital mortality. *Angiogenesis*. 2021;1-13. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09762-6>
- Philippe A, Gendron N, Bory O, et al. Von Willebrand factor collagen-binding capacity predicts in-hospital mortality in COVID-19 patients: insight from VWF/ADAMTS13 ratio imbalance. *Angiogenesis*. 2021;1-5. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09789-3>
- Delrue M, Siguret V, Neuwirth M, et al. von Willebrand factor / ADAMTS13 axis and venous thromboembolism in moderate-to-severe COVID-19 patients. *Br J Haematol*. 2021;192:1097-1100.
- Doevelaar AAN, Bachmann M, Hölzer B, et al. von Willebrand factor multimer formation contributes to immunothrombosis in coronavirus disease 2019. *Crit Care Med*. 2021;49:e512-e520.
- Turecek PL, Peck RC, Rangarajan S, et al. Recombinant ADAMTS13 reduces abnormally up-regulated von Willebrand factor in plasma from patients with severe COVID-19. *Thromb Res*. 2021;201:100-112.
- Sweeney JM, Barouqa M, Krause GJ, Gonzalez-Lugo JD, Rahman S, Gil MR. Low ADAMTS13 activity correlates with increased mortality in COVID-19 patients. *TH Open*. 2021;5:e89-e103.
- Pascreau T, Zia-Chahabi S, Zuber B, Tcherakian C, Farfour E, Vasse M. ADAMTS 13 deficiency is associated with abnormal distribution of von Willebrand factor multimers in patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2021;138-140. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2021.02.008>
- Fox SE, Akmatbekov A, Harbert JL, Li G, Quincy Brown J, Vander Heide RS. Pulmonary and cardiac pathology in African American patients with COVID-19: an autopsy series from New Orleans. *Lancet Respir Med*. 2020;8:681-686.
- Capecchi M, Mocellini C, Abbruzzese C, Mancini I, Prati D, Peyvandi F. Dramatic presentation of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura associated with COVID-19. *Haematologica*. 2020;105:e540.
- Beaulieu M-C, Mettelus DS, Rioux-Massé B, Mahone M. Thrombotic thrombocytopenic purpura as the initial presentation of COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2021;19:1132-1134.
- Albiol N, Awol R, Martino R. Autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) associated with COVID-19. *Ann Hematol*. 2020;99:1673-1674.
- Hindilerden F, Yonal-Hindilerden I, Akar E, Kart-Yasar K. Covid-19 associated autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura: report of a case. *Thromb Res*. 2020;195:136-138.
- Dhingra G, Maji M, Mandal S, Vaniyath S, Negi G, Nath UK. COVID 19 infection associated with thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Thrombolysis*. 2021;1-4. <https://doi.org/10.1007/s11239-021-02452-0>
- Tehrani HA, Darnahal M, Vaezi M, Haghghi S. COVID-19 associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP); a case series and mini-review. *Int Immunopharmacol*. 2021;93:107397.
- Arulkumar N, Thomas M, Brealey D, et al. Plasma exchange for COVID-19 thrombo-inflammatory disease. *eJHaem*. 2021;2(1):26-32. <https://doi.org/10.1002/jha2.140>
- Azoulay E, Zafrani L, Mirouse A, Lengliné E, Darmon M, Chevret S. Clinical phenotypes of critically ill COVID-19 patients. *Intensive Care Med*. 2020;46:1651-1652.
- Susen S, Tacquard CA, Godon A, et al. Prevention of thrombotic risk in hospitalized patients with COVID-19 and hemostasis monitoring. *Crit Care*. 2020;24:364.
- Zhang L, Yan X, Fan Q, et al. D-dimer levels on admission to predict in-hospital mortality in patients with Covid-19. *J Thromb Haemost*. 2020;18:1324-1329.
- Peigne V, Azoulay E, Coquet I, et al. The prognostic value of ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13) deficiency in septic shock patients involves interleukin-6 and is not dependent on disseminated intravascular coagulation. *Crit Care*. 2013;17(6):R273.
- Falter T, Rossmann H, Menge P, et al. No evidence for classic thrombotic microangiopathy in COVID-19. *J Clin Med*. 2021;10:671.

**How to cite this article:** Joly BS, Darmon M, Dekimpe C, et al. Imbalanced of von Willebrand factor and ADAMTS13 axis is rather a biomarker of strong inflammation and endothelial damage than a cause of thrombotic process in critically ill COVID-19 patients. *J Thromb Haemost*. 2021;19:2193-2198. <https://doi.org/10.1111/jth.15445>



## REVIEWS

# TTP: From empiricism for an enigmatic disease to targeted molecular therapies

Nuno A. G. Graça<sup>1,†</sup>  | Bérangère S. Joly<sup>2,3,†</sup>  | Jan Voorberg<sup>1,4,†</sup>  |  
 Karen Vanhoorelbeke<sup>5,†</sup>  | Nicolas Béranger<sup>2,3</sup> | Agnès Veyradier<sup>2,3,†</sup>  | Paul Coppo<sup>3,6,7,†</sup> 

<sup>1</sup>Department of Molecular Hematology, Sanquin-Academic Medical Center, Landsteiner Laboratory, Amsterdam, The Netherlands

<sup>2</sup>Service d'hématologie biologique and EA3518- Institut universitaire d'hématologie, Groupe Hospitalier Saint Louis-Lariboisière, AP-HP, Université Paris Diderot, Paris, France

<sup>3</sup>Centre de Référence des Microangiopathies Thrombotiques, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France

<sup>4</sup>Department of Experimental Vascular Medicine, Amsterdam UMC, Amsterdam, The Netherlands

<sup>5</sup>Laboratory for Thrombosis Research, IRF Life Sciences, KU Leuven Campus Kulak Kortrijk, Kortrijk, Belgium

<sup>6</sup>Service d'Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France

<sup>7</sup>Sorbonne Université, UPMC Univ Paris, Paris, France

## Correspondence

Paul Coppo, Centre de Référence des Microangiopathies Thrombotiques, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France.  
 Email: paul.coppo@aphp.fr

Jan Voorberg, Department of Molecular Hematology, Sanquin-Academic Medical Center, Landsteiner Laboratory, Amsterdam, The Netherlands.  
 Email: j.voorberg@sanquin.nl

## Funding information

Innovations Department of Sanquin (Sanquinovate), Grant/Award Number: Research Project SQL/00049 and SQL/00060; This work was supported by the funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement., Grant/Award Number: 675746

## Abstract

The 100th anniversary of the first description of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) as a disease by Dr. Eli Moschcowitz approaches. For many decades, TTP remained mostly a mysterious fatal condition, where diagnosis was often post-mortem. Initially a pentad of symptoms was identified, a pattern that later revealed to be fallible. Sporadic observations led to empiric interventions that allowed for the first impactful breakthrough in TTP treatment, almost 70 years after its first description: the introduction of plasma exchange and infusions as treatments. The main body of knowledge within the field was gathered in the latest three decades: patient registries were set and proved crucial for advancements; the general mechanisms of disease have been described; the diagnosis was refined; new treatments and biomarkers with improvements on prognosis and management were introduced. Further changes and improvements are expected in the upcoming decades. In this review, we provide a brief historic overview of TTP, as an illustrative example of the success of translational medicine enabling to rapidly shift from a management largely based on empiricism to targeted therapies and personalized medicine, for the benefit of patients. Current management options and present and future perspectives in this still evolving field are summarized.

†On behalf of the PROFILE consortium.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *British Journal of Haematology* published by British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd.



## A BRIEF HISTORY OF THROMBOTIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA (TTP)

The 100th anniversary of the first description of a TTP case is approximately three years away. Despite this disease being known for almost one full century, the state-of-the-art knowledge in TTP had a slow initial evolution whereas during the last 30 years it has seen an explosive expansion.

In Manhattan 1924, Dr. Eli Moschowitz attended a 16-year-old girl, who died after hospitalization for an acute illness displaying high fever, pallor, arm pain, petechiae, paralysis of the left arm and leg, and a preterminal coma. The autopsy revealed multiple 'hyaline' thrombi in the heart muscle vessels, the congested spleen, and kidneys. The disease cause and right treatment remained elusive, but Moschowitz made an important note about an observation of one of his colleagues, Dr. Max Lederer, who had seen four other similar cases where, in contrast to Moschowitz's case, all patients had clinical improvement following blood transfusions.<sup>1</sup> These observations were published later, and although they most closely resembled autoimmune or infectious haemolytic anaemia, they supported the view that some haemolytic pathologies could be treated by transfusion. This scenario was replicated later by Rubinstein et al, on another patient, with an associated rise in platelet counts and a drop in reticulocytes percentage.<sup>2</sup> The name 'Thrombotic Thrombocytopenic Purpura' was first used only in 1947 after another fatal case, where three autopsy findings stood out: hyaline thrombi, a severe thrombocytopenia and petechiae/purpura.<sup>3</sup> Accumulating cases made it possible to detect the main patterns of disease, with fast clinical deterioration and a pentad of unspecific symptoms first described by Amorosi and Ultman in 1966: fever, haemolytic anaemia with abundant schistocytes, thrombocytopenia (by consumption), purpura or other bleeding symptoms, neurologic signs (transient or permanent) and renal disease. The aetiology and pathophysiology remained elusive, with suggested causes including drugs, toxins, viral infections, and autoimmunity, all requiring more conclusive evidence. As a consequence, the disease was almost always fatal despite administration of various combinations of vitamins, adrenocorticotropin, corticosteroids, azathioprine, nitrogen mustard, anti-platelet agents such as dipyridamole or aspirin, heparin, streptokinase or splenectomy.<sup>4</sup> By the early 1960's, deficiency of an important factor in TTP patients and plasma therapy potential value was already recognized,<sup>5</sup> eventually leading TTP to be considered a congenital disease.<sup>6</sup> In the late 1970's Bukowski et al reported a small series of patients treated by exchange transfusion where remission rates rose to 60%<sup>7</sup> and Byrnes et al found through a series of exchange transfusions with different hemoderivatives that the missing factor was present in plasma.<sup>8</sup> Soon after, Gottschall et al described a series of 11 patients with a clinical diagnosis of TTP and their evolution in accordance with the type of blood products they received during exchange therapies.<sup>9</sup> Three patients who received platelet-poor whole

### KEY POINTS

1. The main advances in the understanding of the century-old disease Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) pathophysiology took place during the last three decades, and were successfully translated into diagnostic and therapeutic improvements.
2. Today, innovative technologies are driving profound changes in the diagnosis and treatment standards for TTP, making TTP an illustrative success of translational medicine.
3. In a foreseeable future, historical treatments such as therapeutic plasma exchange and plasma therapy for TTP may become obsolete with the upcoming inception of rhADAMTS13 for clinical use, the introduction of caplacizumab, and the extensive use of rituximab.
4. Knowledge gaps still exist, as it is yet not fully known how TTP patients develop cognitive impairments, and we must reinforce measures against cardiovascular risk factors and premature death, which are still prevalent in TTP patients.

blood all survived, whereas one out of three patients who received platelet-rich whole blood and two out of four patients treated by platelet concentrates with or without whole blood eventually died. Notably, the condition of one patient deteriorated within minutes after receiving platelet-rich whole blood. This last observation led to the general contraindication of platelet transfusion during TTP. These works slowly began to shape the pathogenesis of TTP, believed to be caused by a deficient inhibitor of platelet activation usually present in normal plasma.<sup>10</sup> Simultaneously these reports and others<sup>10,11</sup> added to the possibility of the disease being related to autoimmunity, because patients with systemic lupus erythematosus (SLE) were observed to often develop TTP, and because glucocorticoids used alone provided occasionally successful remissions.<sup>7,8</sup> Plasma therapy became the established gold standard treatment, as well as the usefulness of clinical follow-up by means of lactate dehydrogenase (LDH) and platelet counts, but no standardized regimen was yet established at the time, despite an observed correlation between recovery and dose of plasma administered.<sup>11,12</sup> During the early 1980s, Moake *et al.* helped understanding of the basic pathophysiology mechanism of TTP leap forward<sup>13</sup>: 'unusually large' (or ultralarge) von Willebrand factor multimers (UL-VWF) released from endothelial cells were found to accumulate in the plasma of patients with chronic relapsing TTP and a failure to process these UL VWF multimers was proposed to explain the disorder.<sup>13</sup>

The year 1991 marked the beginning of the modern TTP treatment era. Plasma Exchange (PEX) was shown to be superior to plasma infusions for successful remission



of the majority of TTP patients, moving the historically low survival rates of 10%–20% up to ~80% and firmly establishing an effective first-line treatment.<sup>14,15</sup> Between 1996 and 1998, knowledge in TTP exploded: first in 1996, the Swiss group of Furlan *et al.*<sup>16</sup> and the American group of Tsai<sup>17</sup> for the first time purified from plasma a metalloprotease specifically cleaving VWF (VWF-Cleaving Protease, VWF-CP, which would later become known as ADAMTS13); second, in 1997, Furlan *et al.* published the first case report of severe VWF-CP deficiency in a TTP patient<sup>18</sup>; third, in 1998, the same groups published in the same issue of the *New England Journal of Medicine* the first reports of severe VWF-CP deficiency in TTP cohorts.<sup>19,20</sup> Since 1998, several studies worldwide have confirmed the role of this VWF-CP/ADAMTS13 deficiency in TTP, the main mechanisms of ADAMTS13 deficiency were uncovered,<sup>20–22</sup> ADAMTS13 was cloned, recombinant ADAMTS13 was produced and characterized,<sup>23</sup> and further molecular structural insights were discovered, namely a conformational plasticity of ADAMTS13 (generally referred to ‘open/closed conformation’).<sup>24–27</sup> These stimulating and promising discoveries prompted clinicians, biologists and researchers to work together. These synergistic collaborations resulted in/from the establishment of local or national TTP patient registries and thrombotic microangiopathy (TMA) reference centres with well-organized and characterized biobanks, which have been a critical element driving forward all this knowledge. The main TTP local or national registries today include the registries of Canada, Oklahoma (USA), Italy, United Kingdom, France, Japan, Switzerland and Australia.<sup>28–36</sup> There is a large contrast between the sparsity of milestones in the first seven decades and the explosive number of ground-breaking achievements in the field done within the last three decades (Figure S1), namely:

1. TTP was distinguished from other closely resembling TMAs (notably Haemolytic Uremic Syndrome, HUS).<sup>19,20</sup>
2. Two forms of TTP were identified, with distinct mechanisms: congenital or hereditary TTP (cTTP or hTTP),<sup>21</sup> and acquired TTP (aTTP).<sup>18–20,37</sup>
3. ADAMTS13 was identified as the VWF-CP and cloned for recombinant protein production.<sup>23</sup>
4. ADAMTS13 activity assays were developed and refined. The first assays were laborious, involving the mixing of patient plasma with healthy donors’ plasmas to detect the presence of ADAMTS13 inhibitors. This was done by means of incubation of these mixtures with barium chloride and dialysis against a denaturing agent, running the resulting VWF multimers in agarose gels and subsequently immunoblotting to assess cleavage of the multimers<sup>19</sup> and/or to detect the presence or absence of specific VWF cleavage products.<sup>20</sup> These were succeeded by other less cumbersome assays, such as the ELISA collagen binding assay,<sup>38</sup> and later the FRETs-vWF73 assay,<sup>39</sup> the current gold standard. Other promising assays are still being developed and validated.<sup>40</sup>
5. Epitope mapping studies of immune-mediated TTP (iTTP) patients’ autoantibodies have progressively revealed that in the majority of patients the spacer domain of ADAMTS13 is targeted by autoantibodies.<sup>41–43</sup> Several domains of ADAMTS13 may be targeted simultaneously in almost any combination<sup>44–47</sup>; nonetheless, anti-spacer antibodies, when present, normally constitute the main bulk of the autoantibodies’ mixtures in iTTP patients.<sup>45,47–49</sup>
6. The long-term description of patients’ outcome following the acute phase, leading to consider TTP as a chronic relapsing disease.<sup>15,50,51</sup>
7. Successful new treatments with profound impacts for relapse prevention and disease management were introduced:
  - a. rituximab used as first-line adjunctive treatment for iTTP patients or as pre-emptive treatment<sup>52</sup>;
  - b. more recently, caplacizumab as an adjunctive treatment in iTTP<sup>53–56</sup>;
  - c. the ongoing development of a therapeutic, recombinant human form of ADAMTS13 (rhADAMTS13).<sup>57</sup>

The intense research of the last decades led to several new players that introduced progressive but important changes in the field. Consequently, the terminology has also changed, with official terms being introduced in 2017.<sup>58</sup> Important terms defined in this consensus report included: ‘immune-mediated TTP’ (iTTP) now used for aTTP cases where there is proof of the immune system’s involvement (i.e. presence of detectable autoantibodies); ‘remission’, ‘exacerbation’ and ‘refractoriness’.<sup>58</sup> More recently, as TTP entered in the era of targeted therapies and precision medicine, new definitions incorporating ADAMTS13 activity as a decision-making criterion became necessary. Besides ‘clinical response’ (a recovery of platelets and LDH levels, with exacerbations still possible) and ‘clinical remission’ (a more definitive clinical response lasting at least 30 days after PEX and caplacizumab are stopped, or improved ADAMTS13 activity  $\geq 20\%$ , whichever occurs first), response to new standards of care now uses ‘ADAMTS13 response’, either ‘partial’ (ADAMTS13 activity detectable but below normal values) or ‘complete’ (normal ADAMTS13 activity). This new terminology reflects the need to address more systematically than before the autoimmune component of the disease, and the increasing use of B-cell immunomodulators (mostly rituximab) front-line.<sup>59,60</sup>

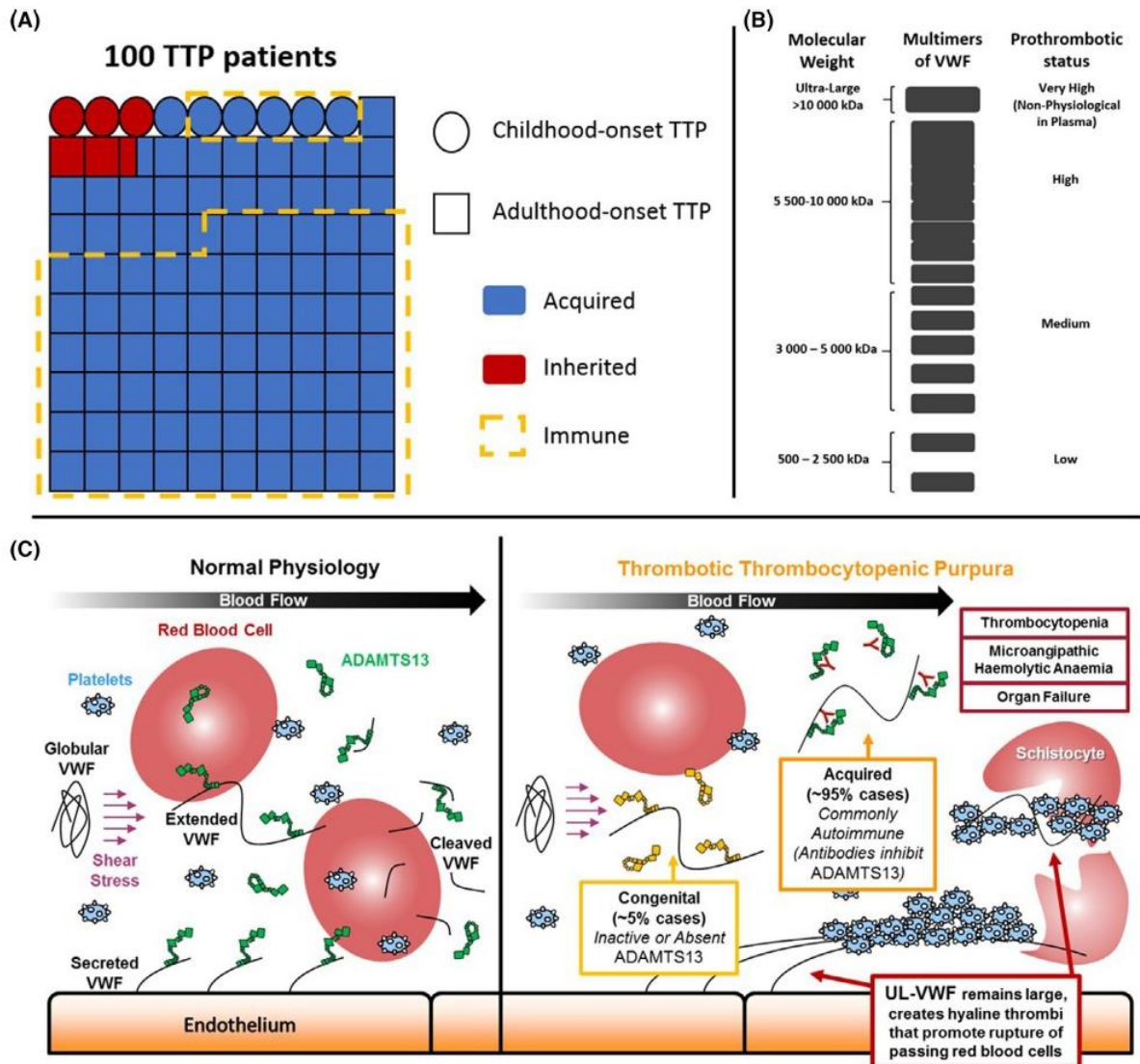
## TTP AS WE KNOW IT TODAY – WHERE ARE WE?

An ADAMTS13 activity  $<10\%$  (or  $<10$  IU/dl) is the most specific biomarker for TTP.<sup>61</sup> It leads to accumulation of UL-VWF multimers, and can be either because of: (a) a hereditary set of (autosomal recessive) mutations that directly impair activity, synthesis, or secretion of the protease (cTTP, ~5% of cases),<sup>21,62</sup> with clusters identified in several regions of the globe<sup>63–65</sup>; or (b) due to an acquired impairment because of developed autoantibodies against ADAMTS13 (iTTP, ~95% of all cases).<sup>30,34,66</sup> It can occur at any age (9% childhood-onset TTP



and 91% adult-onset TTP) with a general female-to-male ratio of 2:1 in the immune-mediated form. The relative incidences of cTTP and iTTP in the different age groups show some contrast: 33% of childhood-onset TTP cases are cTTP, while only 3% of adult-onset TTP cases are cTTP. Almost all adult-onset cTTP cases are detected in women during pregnancy or other obstetrical conditions (miscarriage or stillbirth), where the prevalence of cTTP was found surprisingly high, reaching 50% to 66% of cases.<sup>67-69</sup> Multimeric VWF (including UL-VWF)

exists within Weibel–Palade bodies of endothelial cells and α-granules of platelets, and multimers are secreted to the bloodstream upon stimuli that activate the endothelium.<sup>70</sup> The VWF molecule is a force sensor, sensitive to the shear stress generated by blood flow. When shear stress is high enough to extend the VWF A2 domain, cleavage by ADAMTS13 occurs. With little to no ADAMTS13 activity, UL-VWF remains large in size with potent pro-thrombotic effects (Figure 1).<sup>71</sup> Decreased ADAMTS13 activity and antigen levels are natural



**FIGURE 1** A representation of current Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) epidemiology and its main mechanisms. (A) An overview of a population of 100 TTP patients and the likely distribution of the different types of TTP is shown (adapted from reference 69). (B) The multimeric size distribution of von Willebrand factor (VWF; adapted from reference 71). (C) Comparison between normal physiologic conditions of blood flow and TTP. The basic mechanisms of disease are shown, as well as the characteristic signs and symptoms. The relative sizes of ADAMTS13, autoantibodies, VWF multimers and blood cell components is not to scale. In physiologic conditions, functional ADAMTS13 (green ADAMTS13 molecules) cleaves [unusually large (UL)]-VWF multimers that are secreted from endothelial cells and unravel under high shear stress conditions. In TTP, ADAMTS13 is not functional (activity <10%) either due to mutations (yellow ADAMTS13 molecules)/lack of its secretion (cTTP), or because of autoantibodies that target functional ADAMTS13 and directly inhibit its activity and/or clear it from circulation (iTTP). In TTP, UL-VWF multimers are not processed and this facilitates platelet recruitment and thrombosis within the circulation, as well as red-blood-cell damage (red blood cells get fragmented and will appear as schistocytes in a blood film)



during pregnancy, and are caused by the increased secretion of VWF antigen which occurs during a normal pregnancy (prominently during the second and third trimesters) and/or hormonal changes.<sup>72</sup> Additionally, increased levels of inflammation (particularly present in the case of infections) may also concur to tilt the balance of the ADAMTS13-VWF axis.<sup>73,74</sup> In line with these statements, a remaining enigmatic aspect of cTTP pathophysiology is the absence of systematic correlation between genotype and phenotype, as illustrated by some families where certain members are severely affected and others with the same allelic mutations on *ADAMTS13* gene reach an advanced age with no attacks. Such observations support the existence of triggers but also modifiers in cTTP.<sup>75</sup> The total volume of platelets in circulation of a normal adult is typically only 10–20 ml, making it easy to develop pronounced thrombocytopenia through VWF–platelet aggregates.<sup>76</sup> More rarely however, the development of TTP signs and symptoms can be asynchronous, as the sequestration of platelets may occur in sites with lower shear stress without causing haemolytic anaemia, and/or the thrombus may be localized to a critical site, causing a life-threatening thromboembolic event before overt haemolytic anaemia or thrombocytopenia.<sup>77</sup> Lesions tend to occur in the heart, pancreas, kidney and the brain, without extensive necrosis, suggesting transient occlusion of the blood vessels in these sites.<sup>78</sup>

A delay in the management of TTP worsens its prognosis. Several ADAMTS13 assays exist,<sup>79,80</sup> and having the ADAMTS13 activity results early at presentation would allow a fast and effective distinction of TTP from another TMA. Since ADAMTS13 tests are not always directly available in all healthcare facilities,<sup>80</sup> time lags usually exist<sup>81</sup> and therefore the initial diagnosis of TTP is frequently a clinical diagnosis. To assist the clinician in predicting the ADAMTS13 activity level, clinical score systems have been developed.<sup>31,82,83</sup> Among the most popular are the French Score, set out by the French TMA Reference Center (CNR-MAT),<sup>31</sup> and more recently the PLASMIC Score.<sup>83</sup> The difference between both scores is that the French Score presupposes that patients have a TMA with no associated condition. Clinical experience and awareness of TTP as a possible diagnosis is essential to prevent misdiagnosis, delayed treatment<sup>84,85</sup> and adverse outcomes owing to delayed treatment.<sup>86</sup> This aspect is of particular importance at a time when new standards of care started early in the course of disease allow survival of virtually all patients.<sup>87,88</sup>

## MILESTONES IN TTP TREATMENT: MEET THE NEW PLAYERS

### Management of the acute phase: A new standard of care addressing the three pillars of iTTP pathophysiology

Very few randomized studies with definitive conclusions have been performed in the field of TTP due to the rarity of the disease. Indeed, its management is largely based on

empiricism and clinical experience that translated in recent experts' recommendations.<sup>58–60</sup>

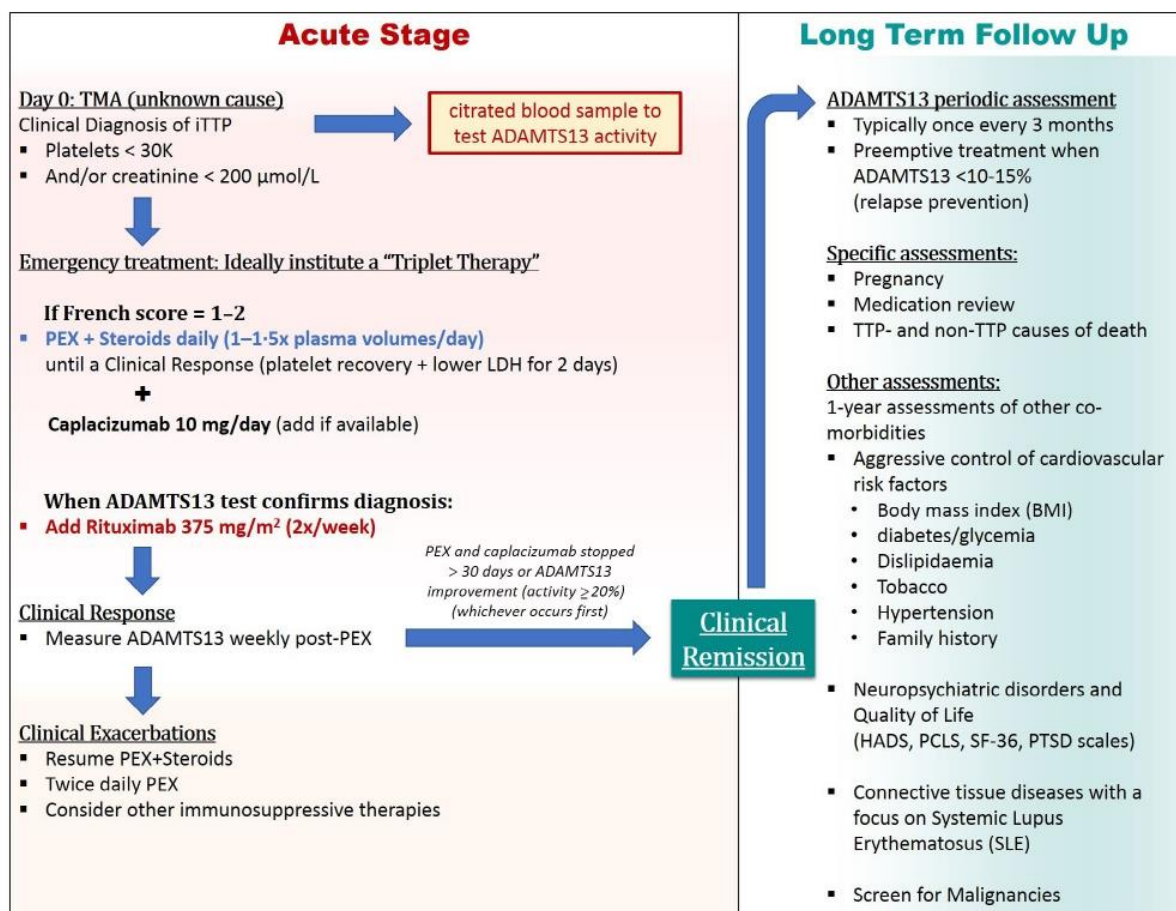
The standard of care (SOC) for TTP has historically relied on plasma therapy, particularly plasma infusions for cTTP cases, and PEX for iTTP cases.<sup>76</sup> The prominent number of iTTP cases historically set the rationale for immunosuppression with corticosteroids front-line together with PEX in the acute phase. Rituximab, a B-cell-depleting monoclonal antibody, has moved from a salvage therapy in cases of refractory TTP or exacerbations<sup>89</sup> to front-line adjunctive therapy.<sup>90,91</sup> It takes on average two weeks for its clinical effects to follow,<sup>52,92</sup> and has very limited adverse effects reported so far.<sup>92,93</sup> After remission, relapses are quite common in iTTP patients and they may happen several years after a durable remission period.<sup>50</sup> Overall, up to 40% of patients with iTTP were reported to relapse during the first 7.5 years with the traditional SOC.<sup>51</sup> However, further analyses of historical control groups managed before the era of rituximab reported higher relapse rates, ranging from 57% at two years to 74% at seven years.<sup>90,94</sup> The systematic assessment of ADAMTS13 activity following the acute phase could refine the risk of relapse. Before the systematic use of rituximab, up to 40% of patients remained with an undetectable ADAMTS13 activity following clinical recovery, and among these patients almost 40% clinically relapsed within one year.<sup>95</sup> Based on these observations, strategies aimed at preventing relapses by means of immunomodulation proved fruitful, and the addition of rituximab as an early adjunctive therapy front-line showed to: (a) shorten the duration of PEX and hospitalizations by seven days; (b) lead to more durable improvements of ADAMTS13 activity; and (c) bear positive impacts on short-term remission and long-term relapse-free survival, with notably one-year relapse-free survivals of 100%.<sup>52,91,96,97</sup>

Caplacizumab is a nanobody that targets the interaction between UL-VWF multimers (VWF A1 domain) and platelets' glycoprotein Ib. The drug was first developed as an antithrombotic agent in the context of myocardial infarction, but greater interest has soon been paid to its therapeutic potential in TTP, and development for the first indication has since been discontinued. Instead, it was approved for acute iTTP treatment in adjunction to SOC.<sup>55,98</sup> In both clinical trials that served for the approval<sup>53–56</sup> as well as in real-world settings, caplacizumab led to faster platelet count recovery and reduced the time for a more durable clinical response, as well as the number of PEX rounds, and hospitalization time, despite the early use of rituximab.<sup>88,99</sup> Caplacizumab could prevent unfavourable outcomes, including death, refractoriness and exacerbations.<sup>53,87,88,99,100</sup> These benefits are attained at the expense of manageable minor bleeding events.<sup>88</sup> Whether caplacizumab has a long-term benefit on neurological complications associated with iTTP remains to be evaluated. Therefore, even considering the decrease in the cost of SOC, the addition of caplacizumab should increment the cost of a single iTTP episode by ~three- to fourfold,<sup>101</sup> which represents a limitation in the use of this new agent. As a result, caplacizumab is not



available in all countries. Lastly, one should consider caplacizumab as a suspensive agent protecting patients until immunosuppression improves ADAMTS13 activity. On the other hand, the price of caplacizumab recognizing its innovative nature should be balanced with the improvement of survival rate in a disease involving young patients.<sup>87,102</sup> As real-world evidence suggests that caplacizumab may be discontinued when ADAMTS13 activity reaches 20% or even 10% activity,<sup>88,103</sup> trials are ongoing to personalize caplacizumab treatment on the basis of ADAMTS13 activity (NCT04720261). Taken together, these new regimens associating systematically PEX, immunosuppression with

corticosteroids and rituximab, and caplacizumab front-line allow achieving impressive survival rates of >95%, far surpassing the historical survival rate of 80%–85% provided by PEX and steroids for 30 years, while alleviating substantially the burden of care.<sup>87,88,99</sup> In line with these statements, intensive salvage regimens including twice-daily PEX, boluses of cyclophosphamide and splenectomy at the acute phase for highly resistant patients should become rare indications while front-line rituximab and caplacizumab are increasingly used.<sup>104</sup> Figure 2 presents the course of a patient with suspected/proven iTTP in a hospital with optimal resources.



**FIGURE 2** The course of a patient with suspected/proven immune-mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (iTTP) in a hospital with optimal resources. Acute stage: if the patient suffers from a thrombotic microangiopathy without any apparent cause, a clinical score should be used to estimate ADAMTS13 levels and a citrated blood sample taken for actual ADAMTS13 activity assessment at the day of presentation (Day 0). The French Score takes into account thrombocytopenia and creatinine values, scoring +1 for each if present. A score of 2 indicates high probability of ADAMTS13 < 10%.<sup>31</sup> In this case, a triplet regimen with daily PEX + steroids and daily caplacizumab is instated. If the clinical score is 1, TTP should still be suspected and PEX + steroids and daily caplacizumab should be initiated and kept until the ADAMTS13 activity test results from Day 0 arrive. If ADAMTS13 ≥ 10%, this is suggestive of an alternative diagnosis. If ADAMTS13 < 10%, the diagnosis of iTTP is confirmed, and rituximab is added (usually by day 4 following PEX initiation). This regimen is kept until a clinical response ensues for two days, at which point PEX is stopped, but the remaining therapies continue, with weekly assessments of ADAMTS13 activity. Caplacizumab may be stopped once adequate ADAMTS13 responses are achieved (>20% or >10%).<sup>88,103</sup> Long-term follow-up: the focus shifts to preventing relapses and long-term morbidity, with periodic assessments of ADAMTS13 activity (typically every three months, with pre-emptive treatment if needed), and yearly assessments to control cardiovascular risk factors, assessment of neuropsychiatric disorders and improvement of quality of life as well as other specific assessments (e.g. pregnancy planning in the case of female patients of childbearing age)



## After the acute phase: How we learnt to prevent long-term relapses

Upon sustained clinical remission achievement, management proceeds with a follow-up focused on relapse prevention. Relapses are associated with ADAMTS13 deficiency<sup>105</sup>; therefore ADAMTS13 activity should be measured in adequate time intervals, being tightened if required. Our practice is to measure ADAMTS13 once every three months for years after the acute phase. Although no formal recommendations have been issued, our practice is to offer a life-long follow-up of ADAMTS13 activity, with a reduction of monitoring only after typically five years of treatment-free survival with normal ADAMTS13 activity. If ADAMTS13 activity drops to values <10–15%, pre-emptive rituximab is usually prescribed, allowing improvement in ADAMTS13 activity in 85% of cases.<sup>94</sup>

## More on long-term follow-up

During long-term follow-up after recovery, iTTP patients have increased premature death and multiple major morbidities, including increased body mass index (BMI), hypertension, major depression, diabetes and chronic kidney disease.<sup>106,107</sup> Notably, up to 30% of iTTP survivors suffer from severe depression and 20% display extremely low/borderline cognitive ability.<sup>107</sup> Age has negative impacts both in the short term (atypical neurological presentation and delayed diagnosis), but also in the long term, as older survivors show increased long-term mortality that increases for every 10 years of age range.<sup>108</sup> Besides iTTP-related deaths, cardiovascular complications are prevalent in iTTP survivors, and are the leading primary cause of death (~28%), followed by malignancy (~21%) and infection (~14%), while other/unknown causes represent 10% of cases.<sup>109</sup> The incidence of strokes in iTTP survivors is fivefold higher than in the general population, and is associated with lower ADAMTS13 activity during remission.<sup>110</sup> In this setting, it becomes important to evaluate and control these added risk factors during follow-up to improve life expectancy and quality of life (QoL) of TTP survivors (Figure 2).

A large proportion of adulthood-onset cTTP is found in obstetric patients.<sup>67–69</sup> Data from the Japanese TTP registry shows that patients diagnosed with cTTP before pregnancy had prior planning consisting of ADAMTS13 activity monitoring and prophylactic plasma infusions throughout pregnancy, allowing for significantly higher live birth rates.<sup>111</sup> The authors suggest initiating prophylactic treatment immediately after conception because patients experience subclinical symptoms that are preventable by prophylactic treatment and the risk of foetal complications and death increases after 20 weeks of gestation. Plasma infusions have inherent limitations, and may be insufficient to prevent gestation complications in cases of uncontrolled cTTP before conception.<sup>111</sup> In this context, it becomes fundamental to identify asymptomatic family

members of cTTP patients (especially sisters of childbearing age).

Of special note, obstetric iTTP is a subpopulation still in need of clearly defined strategies for pre-emptive measures and safe TTP treatments in this setting. Rituximab has been used before pregnancy as a pre-emptive treatment, and women are advised to wait six to nine months after administration before conceiving<sup>112</sup>; some have become pregnant before this without any major adverse effects reported to date.<sup>68</sup> ADAMTS13 activity should be assessed at preconception as it is predictive of pregnancy outcome. Normal ADAMTS13 activity is typically associated with an uneventful pregnancy, and ADAMTS13 assessments through pregnancy usually disclose persistently normal values. Patients with a severe ADAMTS13 deficiency are exposed to clinical relapses with foetal loss and require pre-emptive measures before conception. On the other hand, patients with a partial ADAMTS13 deficiency have the most unpredictable scenario and require at least monthly ADAMTS13 assessments to clarify the prognosis. Patients who experience a severe drop in ADAMTS13 activity during pregnancy require pre-emptive measures including PEX and steroids. Rituximab is ideally reserved for the post-partum period owing to lack of safety evidence.<sup>113</sup>

## A new hope: The recombinant human ADAMTS13 (rhADAMTS13)

ADAMTS13 activity deficiency is a direct cause of TTP. This sets a rationale for using treatments based on direct enzyme replacement of ADAMTS13. In *Adamts13*<sup>-/-</sup> mice where clinical features of TTP are reproduced through overload of VWF as an additional trigger, administration of rhADAMTS13 allowed for clinical and haematological features to be reverted.<sup>114</sup> A first-in-human clinical trial to assess the safety of a single dose of rhADAMTS13 in cTTP patients has been performed and key findings included: (a) a similar pharmacokinetic profile to the wild-type enzyme found in plasma of healthy donors; (b) tolerability in the doses tested (5, 20 or 40 U/kg); and (c) no signs of immunogenicity after 28 days of exposure.<sup>57</sup> The efficacy of rhADAMTS13 for cTTP is now being tested in several phase 3 studies (NCT04683003 and NCT03393975), both as prophylactic and on-demand treatment, and their outcomes are eagerly anticipated.

The most recent data accumulated by the international cTTP registry has shown that the current standards of management of cTTP patients are far from optimal.<sup>115</sup> On top of a median 12-year gap between disease onset and clinical diagnosis, 28% of cTTP patients experienced premature thromboembolic events until enrolment in the cohort, including stroke, transient ischaemic attacks and myocardial infarctions. Incidences occur in all age groups and increase with age: in 50% or more of patients aged >40–50 or >50 years old at least one thromboembolic event has been experienced. Additionally, other neurologic conditions (headaches, mental and depressive disorders,



epilepsy) were common, and 25% of patients had renal insufficiency at the time of enrolment and end-organ damage. Despite this, 71% of patients were receiving regular prophylactic treatment, almost all with plasma products, with the median interval of regular treatments at 14.0 days (range: 2–75 days). The remaining 29% received only on-demand treatment, and the median time of treatment for acute events was seven days, most episodes being associated with a trigger (notably infections, alcohol excess in men, and pregnancy in women).<sup>115</sup> The plasma half-life of plasma-infused ADAMTS13 is two to four days,<sup>116</sup> patients typically reaching undetectable levels by days 7–10 after infusion of two to four units of plasma.<sup>115,117</sup> This leaves time gaps of a few days to weeks where cTTP patients become again vulnerable to (cumulative) end-organ damage and other events. This is apparent by the frequency of acute manifestations, with a median of 0.1 acute episodes/patient/year (range: 0.02–9 acute episodes/patient/year).<sup>115</sup> Importantly, the UK group reported that stroke incidence can be reduced with prophylactic therapy rather than on-demand therapy,<sup>118</sup> prompting to question whether all patients should always be receiving active prophylactic management instead. Yet, not all patients are willing or able to submit themselves to the burden of a tight schedule of prophylactic plasma regimens.<sup>119</sup> Further, 11% of patients in the international cTTP registry had a reported transfusion-transmitted viral disease,<sup>115</sup> and allergic reactions are also frequent, although manageable.<sup>111</sup> The recently published experience of the UK,<sup>118</sup> Swiss<sup>119</sup> and Japanese<sup>120</sup> TTP registries are all convergent: management standards in cTTP must be improved. RhADAMTS13 will allow refinements in the prophylactic regimens used in cTTP: a tighter prophylactic regimen with correct dosing of a pure form of ADAMTS13 will become available, may allow treatment to be continued at home, and may bring the possibility to prevent short-term and long-term comorbidities, as well as the possibility of applying a series of more standardized, yet personalized protocols, for example, depending on the mutations present, age of onset, or frequency of acute events.<sup>121,122</sup>

In iTTP, the scenario for applying rhADAMTS13 is different. The already-ongoing immune response of the patient, the different titres of autoantibodies, and the different ADAMTS13 domains targeted in each individual case will pose challenges. In *in vitro* studies of iTTP patient samples, and also in a rat model of iTTP based on injection of polyclonal goat anti-human ADAMTS13 antibodies, it was possible to override the antibodies with wild-type high-dose rhADAMTS13 and replenish enzyme activity leading to successful treatment of iTTP in these rats.<sup>123–125</sup> Because of these encouraging preclinical results, a clinical trial is currently ongoing to assess the efficacy and safety of wild-type rhADAMTS13 in addition to SOC in aTTP patients (SOAR-HI Trial, NCT03922308). Hurdles regarding standardization of treatment are expectable: dosing schedules and regimens may need to be tailored to each patient. This can likely be improved upon with rhADAMTS13 mutant

variants resistant to a large fraction of the patients' autoantibody mixtures,<sup>126</sup> as long as rhADAMTS13 intrinsic activity is not lost.<sup>49</sup> A full-length ADAMTS13 variant with an artificially introduced *N*-glycan and with these characteristics was recently reported by us.<sup>127</sup> Despite the current lack of *in vivo* data, rhADAMTS13 'bio-betters' like these could possibly be used with some anticipated advantages for the reduction of the burden of care (Figure 3).<sup>128,129</sup>

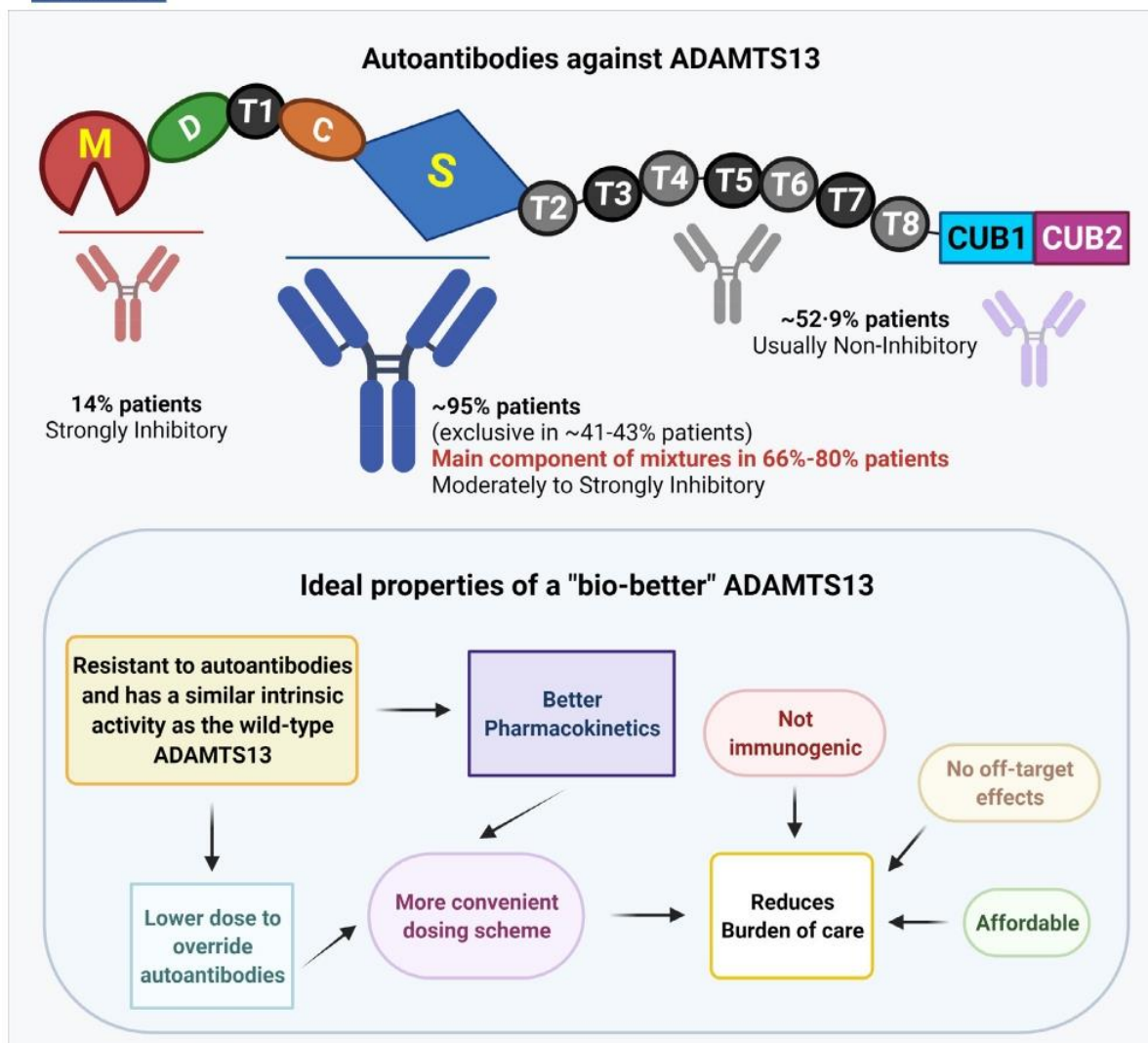
## HOW TO FURTHER DECREASE THE BURDEN OF CARE IN TTP?

In one recent study, the inception of caplacizumab in the current SOC allowed for a significant reduction of deaths and volumes of plasma.<sup>87</sup> The high costs of such a regimen make it urgent for the field to reduce the burden of care. One obvious way to achieve this is through a steep reduction on the PEX regimen, e.g. a simple stoppage of PEX as soon as clinical responses and recovery ensue.<sup>130</sup> Plasma volumes involved in PEX have been a concern due to the risks associated with the procedure and the high plasma volumes necessary.<sup>131</sup> In addition, PEX is a cumbersome and expensive procedure, with complex logistics, and is not always readily available. In line with these statements, recent preliminary reports showed that it is possible to manage some patients without any PEX or plasma therapy at all, based on caplacizumab administration and immunosuppression.<sup>130,132</sup> In a series of case reports, six patients who experienced seven iTTP episodes and managed with such regimen recovered at least 10% of ADAMTS13 activity; all had clinical responses with improvement of platelet counts and lactate dehydrogenase (LDH) values.<sup>132</sup> Consequently, and although PEX still remains a cornerstone in the management of iTTP at the acute phase, PEX-free regimens should become feasible in the future, especially with the perspective of the introduction of rhADAMTS13 as a new player in the field.<sup>122</sup>

A replacement of therapeutic elements by other less expensive but equivalent alternatives is another way to further reduce direct costs: a biosimilar of rituximab has been reported to be equivalent in performance, with significant cost benefits.<sup>133</sup> Rituximab can also be adapted for subcutaneous use with similar performances in iTTP, yet reducing nursing workload, treatment time, and improving patient's satisfaction.<sup>134</sup>

## LIFE WITH TTP: OUTCOMES OF TTP SURVIVORS

Improving relevant clinical outcomes for rare-disease patients and addressing patient concerns is coming into focus.<sup>135,136</sup> iTTP is known to be followed by several sequelae in the central nervous system<sup>137</sup> with chronic fatigue, headache, cognitive impairment, reduced work productivity, depression, anxiety,<sup>136–139</sup> post-traumatic stress disorder<sup>140</sup> and a lower QoL.<sup>136,138,141</sup> Current treatments do not prevent these



**FIGURE 3** The nature of polyclonal autoantibody mixtures in Immune-mediated Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (iTTP) patients and ideal characteristics of a 'bio-better' ADAMTS13. The domain structure of ADAMTS13 in single letter and number codes is shown. From left to right: M, metalloprotease; D, disintegrin; T1, thrombospondin (TSP) repeat 1; C, Cys-rich; S, spacer; T2–T8, TSP repeats 2–8; CUB-1 and CUB-2, complement subcomponent C1r/C1s, embryonic sea urchin protein Uegf, bone morphogenetic protein 1 domain. The general characteristics of patients' autoantibody mixtures are shown, based on compiled data shown in the supplementary data of reference<sup>49</sup>. Below, the ideal characteristics of a 'bio-better' ADAMTS13 are indicated with perspective of the anticipated advantages it should be able to offer over the wild-type rhADAMTS13. Several of these advantages are, in theory, linked. Notwithstanding, the wild-type rhADAMTS13 already promises to offer a significant reduction in the burden of care in iTTP and cTTP.<sup>122</sup> Figure created with BioRender.com

long-term outcomes, yet these are the ones patients complain about the most, although concern profiles are slightly different between cTTP and iTTP.<sup>142</sup> So far, the mechanisms behind the cognitive impairment observed are not yet fully defined, but likely involve ADAMTS13.<sup>143</sup> Microinfarcts and invisible lesions, and silent brain infarcts and other mechanisms are known to cause vascular-impairment dementia.<sup>144</sup> In the case of TTP patients, abnormal MRI scans are associated with neurological involvement at presentation and are predictive of long-term cognitive impairment.<sup>145</sup> These aspects raise the question of the target ADAMTS13 activity to be maintained after an acute TTP event, and may propel in

the future a revision of the current pre-emptive strategies as well as clinical follow-up and therapeutic evaluation according to underlying cardiovascular risk factors. Similar data were recently reported for cTTP patients.<sup>115,118–121</sup>

## THE IMPORTANCE OF PATIENT EMPOWERMENT

Specific strategies for further patient empowerment need to be set. A recent questionnaire study submitted to 120 TTP patients revealed that two-thirds had a low to intermediate



literacy on their own condition, which is normally associated with older age and lower education levels.<sup>146</sup> Importantly, among the whole population studied, 39% of patients did not understand that PEX is mandatory in the acute phase, almost half of them do not consider being at risk of relapse, and 30% of women did not know that pregnancy increases the risk of relapse. Only one-third correctly replied what to do in case of a suspected relapse.<sup>146</sup> These findings show that there is a clear need for patients to better understand their disease (typically using non-technical language) and the importance of medical follow-up. Thereby, every aspect of long-term follow-up including prevention of relapses, pregnancy planning, contraception, identification and management of neurologic sequelae and cardiovascular risk factors must be addressed.

One effective tool for further patient empowerment is encouraging patients and family members to attend TTP support groups. Meeting other patients and exchanging their experiences together with specialists and researchers brings several benefits to both the patients' follow-up and learning, but also directing new research questions.<sup>147</sup>

## THE TARGETS ON THE ROAD – PERSPECTIVES ABOUT THE FUTURE IN TTP

The field of TTP is experiencing several changes at a fast pace with exciting forthcoming challenges:

1. In the years to come, rhADAMTS13 should arise in the therapeutic landscape to bring further changes and reshape the current standards.<sup>122</sup> For iTTP, the strategy of overriding autoantibodies with the wild-type rhADAMTS13<sup>123–125</sup> allows for speculations on a 'bio-better' rhADAMTS13 that would be resistant against a large fraction of most patients' autoantibody mixtures (Figure 3).<sup>49,126,128</sup> We recently reported a full-length ADAMTS13 variant with an artificially introduced N-glycan bearing some of the *in vitro* characteristics of this idealized rhADAMTS13 'bio-better'.<sup>127,129</sup> Although further studies are still required before drawing more definite conclusions, the current scientific evidence is encouraging.
2. Raising the bar in the elderly is a current goal, since age does widen the risk for premature death of iTTP patients.<sup>108</sup> Caplacizumab may not prevent thromboembolic events as efficiently in this subpopulation, for which the use of adequate anti-platelet agents may further improve outcomes.<sup>87</sup>
3. It is necessary to gain more knowledge on the general cognitive deficits TTP patients develop, their mechanisms and how to prevent them. In this regard, caplacizumab and rhADAMTS13 hold a rationale; however there is yet lack of data in this field.<sup>122</sup> The cardiovascular risk factors these patients display must be aggressively controlled to prevent further damage, reduce comorbidities and improve outcomes in light of ADAMTS13 activity.<sup>108,121</sup>

In iTTP, ELISA-based detection of open-conformation ADAMTS13 may become helpful for a differential diagnosis, because it is a hallmark in acute-stage iTTP patients and reverts upon remission or rituximab treatment.<sup>148,149</sup> Importantly, this may become a useful predictive biomarker for imminent relapses.<sup>149,150</sup>

4. As a more long-term perspective, chimaeric antigen receptor (CAR)-T cells for the treatment of autoimmune diseases have attracted much attention. This approach could potentially be useful for treating more definitely the immune component of iTTP by clonally deleting anti-ADAMTS13-specific B-cells.<sup>151</sup>
5. Another strategy that holds promise is the use of gene therapy. In the case of TTP, several approaches have borne fruit in preclinical models: liposomal mRNA treatments,<sup>152</sup> gene transfer systems based on viruses,<sup>153,154</sup> in modified haematopoietic cells,<sup>155</sup> as well as direct hydrodynamic uptake of a sleeping-beauty transposon system carrying the ADAMTS13 gene<sup>156</sup> have all been successfully applied in animal models. They can be used with any ADAMTS13 variant of choice.<sup>152,154</sup> A novel TTP model in zebrafish has recently been reported and may allow further understanding of the pathophysiology and discovery of novel treatments.<sup>157</sup>

After almost one century, TTP survival has now become the norm, and management is becoming simpler. However, the complex consequences of long-term TTP are still being unravelled and knowledge gaps remain that require attention. Studies are ongoing specifically to address these issues, and should shed light on these problems over the upcoming years. In the near future, the treatment landscape will likely see further exciting changes that hold much promise in answering part of the patients' unmet needs and complaints. Added to immunosuppression and caplacizumab, it will be exciting to see how the rhADAMTS13 will hold against the underlying immune response, how its regimen will be established, and how it will further reshape the current standards of practice.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement number 675746 (PROFILE), from the Netherlands Ministry of Health (PPOC-18-022) and from the Innovations Department of Sanquin (Sanquinovate Research Project SQI/00049 and SQI/00060).

## CONFLICT OF INTERESTS

Nuno A. G. Graça and Jan Voorberg are inventors of a patent application regarding autoantibody-resistant ADAMTS13 variants. Karen Vanhoorelbeke is a member of the advisory board of Shire-Takeda and Ablynx-Sanofi. Agnès Veyradier is a member of the French advisory boards for Sanofi, Takeda, and Roche-Chugai. Paul Coppo was a member of advisory boards for and received speaker fees from Sanofi, Alexion, Octapharma, and Takeda. Nicolas Béranger and Bérangère S. Joly declare no conflicts of interest.



## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Nuno A. G. Graça wrote the first draft of the manuscript, designed figures and all authors critically revised the manuscript before submission.

## ORCID

Nuno A. G. Graça  <https://orcid.org/0000-0001-5694-1836>

Bérangère S. Joly  <https://orcid.org/0000-0003-0151-337X>

Jan Voorberg  <https://orcid.org/0000-0003-4585-2621>

Karen Vanhoorelbeke  <https://orcid.org/0000-0003-2288-8277>

Agnès Veyradier  <https://orcid.org/0000-0001-7773-5003>

Paul Coppo  <https://orcid.org/0000-0002-4618-2095>

## REFERENCES

- Moschcowitz E. An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries - an undescribed disease. *Arch Intern Med.* 1925;36:89–93.
- Rubinstein BMA, Kagan BM, Macgillviray MH, Merliss R, Sacks H, Hills B. Unusual remission in a case of thrombotic thrombocytopenic purpura syndrome following fresh blood exchange transfusions. *Ann Intern Med.* 1959;51(6):1409–19.
- Singer K, Bornstein F, Wile S. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1947;2(6):542–54.
- Amorosi EL, Ultmann JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: Report of 16 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 1966;45(2):139–53.
- Schulman I, Pierce M, Lukens A, Currimbhoy Z. Studies on Thrombopoiesis 1. A factor in Normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. *Blood.* 1960;16(1):943–57.
- Upshaw JD. Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 1978;298(24):1350–2.
- Bukowski RM, King JW, Hewlett JS. Plasmapheresis in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1977;50(3):413–7.
- Byrnes JJ, Khurana M. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma. *N Engl J Med.* 1977;297(25):1386–9.
- Gottschall JL, Pisciotto AV, Darin J, Hussey CV, Aster RH. Thrombotic thrombocytopenic purpura: experience with whole blood exchange transfusion. *Semin Thromb Hemost.* 1981;7(1):25–32.
- Lian E, Harkness D, Byrnes J, 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;53(2):333–8.
- Taft E. Thrombotic thrombocytopenic purpura and dose of plasma exchange. *Blood.* 1979;54(4):842–9.
- Toffelmire EB, William Clark CF, Peter Cordy FE, Adam Linton FL, Reinhart Lohmann FC. Plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Can Med Assoc J.* 1984;131:1371–6.
- 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;307(23):1432–5.
- 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. *N Engl J Med.* 1991;325(6):393–7.
- 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;325(6):398–403.
- 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):4223–34.
- 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):4235–44.
- 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;89(9):3097–103.
- 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;339(22):1578–84.
- Tsai H-M, Lian EC-Y. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1998;339(22):1585–94.
- Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, Mcclintock JN, McGee BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature.* 2001;413(4):488–94.
- 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.* 2006;4:1707–17.
- 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;100(10):3626–32.
- 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;106(13):4139–45.
- South K, Luken BM, Crawley JTB, Phillips R, Thomas M, Collins RF, et al. Conformational activation of ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(52):18578–83.
- 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.* 2014;111(52):18584–9.
- Petri A, Kim HJ, Xu Y, de Groot R, Li C, Vandenbulcke A, et al. Crystal structure and substrate-induced activation of ADAMTS13. *Nat Commun.* 2019;10(1):1–16.
- Leblond P, Rock G, Herbert C. The use of plasma as a replacement fluid in plasma exchange. *Transfusion.* 1998;38:834–8.
- George JN, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, Vesely SK, Lämmle B. The Oklahoma thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome registry: the Swiss connection. *Eur J Haematol.* 2008;80(4):277–86.
- Scully M, Yarranton H, Liesner R, Cavenagh J, Hunt B, Benjamin S, et al. Regional UKTTP registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. *Br J Haematol.* 2008;142(5):819–26.
- Coppo P, Schwarzingger 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.
- Fujimura Y, Matsumoto M. Registry of 919 patients with thrombotic microangiopathies across Japan: database of Nara Medical University during 1998–2008. *Intern Med.* 2010;49(1):7–15.
- Blombery P, Kivivali L, Pepperell D, Mcquilten Z, Engelbrecht S, Polizzotto MN, et al. Diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) in Australia: findings from the first 5 years of the Australian TTP/thrombotic microangiopathy registry. *Intern Med J.* 2016;46(1):71–9.
- Mariotte E, Azoulay E, Galicier L, Rondeau E, Zouiti F, Boisseau P, et al. Epidemiology and pathophysiology of adulthood-onset thrombotic microangiopathy with severe ADAMTS13 deficiency (thrombotic thrombocytopenic purpura): a cross-sectional analysis of the French national registry for thrombotic microangiopathy. *Lancet Haematol.* 2016;3(5):E237–45.
- Lotta LA, Mariani M, Consonni D, Mancini I, Palla R, Maino A, et al. Different clinical severity of first episodes and



- recurrences of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2010;151(5):488–94.
36. Mancini I, Pontiggia S, Palla R, Artoni A, Valsecchi C, Ferrari B, et al. Clinical and laboratory features of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: fourteen years of the Milan TTP registry. *Thromb Haemost.* 2019;119(5):695–704.
  37. 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;91(8):2839–46.
  38. Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Lämmle B, Furlan M. Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF. A tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thromb Haemost.* 1999;82(5):1386–9.
  39. 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(1):93–100.
  40. Beranger N, Benghezal S, Joly BS, Capdenat S, Delton A, Stepanian A, et al. Diagnosis and follow-up of thrombotic thrombocytopenic purpura with an automated chemiluminescent ADAMTS13 activity immunoassay. *Res Pract Thromb Haemost.* 2021;5(1):81–93.
  41. Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, Dorner F, Lämmle B, Mannucci PM, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2004;103(12):4514–9.
  42. 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;115:1640–9.
  43. 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;96(11):1670–7.
  44. Long Zheng X, 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;95(9):1555–62.
  45. Thomas MR, de Groot R, Scully MA, Crawley JTB. Pathogenicity of anti-ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *eBioMedicine.* 2015;2:942–52.
  46. Velásquez Pereira LC, Roose E, Graça NAG, Sinkovits G, Kangro K, Joly BS, et al. Immunogenic hotspots in the spacer domain of ADAMTS13 in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2021;19(2):478–88.
  47. Kangro K, Roose E, Joly BS, Sinkovits G, Falter T, von Auer C, et al. Anti-ADAMTS13 autoantibody profiling in patients with immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv.* 2021;5(17):3427–35.
  48. Casina VC, Hu W, Mao J-H, Lu R-N, Hanby HA, Pickens B, et al. High-resolution epitope mapping by HX MS reveals the pathogenic mechanism and a possible therapy for autoimmune TTP syndrome. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(31):9620–5.
  49. Graça NAG, Ergic B, Velásquez Pereira LC, Kangro K, Kaijen P, Nicolaes GAF, et al. Modifying ADAMTS13 to modulate binding of pathogenic autoantibodies of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2020;105(11):2619–30.
  50. Shumak KH, Rock GA, Nair RC. Late relapses in patients successfully treated for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med.* 1995;122(8):569–72.
  51. Hovinga JAK, Vesely SK, Terrell DR, Lämmle B, George JN. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2010;115(8):1500–11.
  52. Froissart A, Veyradier A, Hié M, Benhamou Y, Coppo P. Rituximab in autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura: A success story. *Eur J Intern Med.* 2015;26(9):659–65.
  53. Peyvandi F, Scully M, Hovinga JAK, Cataland S, Knöbl P, Wu H, et al. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2016;374(6):511–22.
  54. Peyvandi F, Scully M, Kremer Hovinga JA, Knöbl P, Cataland S, De Beuf K, et al. Caplacizumab reduces the frequency of major thromboembolic events, exacerbations and death in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2017;15(7):1448–52.
  55. Duggan S. Caplacizumab: first global approval. *Drugs.* 2018;78(15):1639–42.
  56. Knoebl P, Cataland S, Peyvandi F, Coppo P, Scully M, Kremer Hovinga JA, et al. Efficacy and safety of open-label caplacizumab in patients with exacerbations of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura in the HERCULES study. *J Thromb Haemost.* 2020;18(2):479–84.
  57. Scully M, Knöbl P, Kentouche K, Rice L, Windyga J, Schneppenheim R, et al. Recombinant ADAMTS-13: first-in-human pharmacokinetics and safety in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;130(19):2055–63.
  58. Scully M, Cataland S, Coppo P, de la Rubia J, Friedman KD, Kremer Hovinga J, et al. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost.* 2017;15(2):312–22.
  59. Cuker A, Cataland SR, Coppo P, Rubia J de la, Friedman KD, George JN, et al. Redefining outcomes in immune TTP: an international working group consensus report. *Blood.* 2021;137(14):1855–61.
  60. Zheng XL, Vesely S, Cataland S, Coppo P, Geldziler B, Iorio A, et al. ISTH guidelines for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2020;18:2496–502.
  61. George JN, Nester CM. Syndromes of thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med.* 2014;371(7):654–66.
  62. 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;108(7):2207–15.
  63. 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;103(4):1305–10.
  64. Veyradier A, Lavergne JM, Ribba AS, 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.* 2004;2(3):424–9.
  65. von Krogh AS, Quist-Paulsen P, Waage A, Langseth O, Thorstensen K, Brudevold R, et al. High prevalence of hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura in Central Norway: from clinical observation to evidence. *J Thromb Haemost.* 2016;14(1):73–82.
  66. George JN, Vesely SK, Terrell DR. The Oklahoma thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome (TTP-HUS) registry: a community perspective of patients with clinically diagnosed TTP-HUS. *Semin Hematol.* 2004;41(1):60–7.
  67. 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;119(24):5888–97.
  68. Scully M, Thomas M, Underwood M, Watson H, Langley K, Camilleri RS, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura and pregnancy: presentation, management, and subsequent pregnancy outcomes. *Blood.* 2014;124(2):211–9.
  69. Joly BS, Coppo P, Veyradier A. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2017;129(21):2836–46.
  70. Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence.* 2013;4(6):507–16.
  71. Stocksclaeder M, Schneppenheim R, Budde U. Update on von Willebrand factor multimers: focus on high-molecular-weight multimers and their role in hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2014;25(3):206–16.
  72. Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, Deckmyn H. ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol.* 2007;138(June):534–40.



73. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand-factor multimers under flow. *Blood*. 2004;104(1):100–6.
74. Cao WJ, Niiya M, Zheng XW, Shang DZ, Zheng XL. Inflammatory cytokines inhibit ADAMTS13 synthesis in hepatic stellate cells and endothelial cells. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1233–5.
75. Bennett M, Chubar Y, Gavish I, Aviv A, Stemer G, Chap-Marshak D. Experiences in a family with the upshaw-schulman syndrome over a 44-year period. *Clin Appl Thromb*. 2014;20(3):296–303.
76. Sadler JE. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2017;130(10):1181–8.
77. Htun KT, Davis AK. Neurological symptoms as the sole presentation of relapsed thrombotic thrombocytopenic purpura without microangiopathic haemolytic anaemia. *Thromb Haemost*. 2014;112(4):838–40.
78. Hosler GA, Cusumano AM, Hutchins GM. Thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome are distinct pathologic entities—a review of 56 autopsy cases. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127(July):834–9.
79. Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, Mackie I, Scully MA, Machin SJ. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2010;8(4):631–40.
80. Mackie I, Mancini I, Muia J, Kremer Hovinga J, Nair S, Machin S, et al. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for laboratory measurement of ADAMTS13. *Int J Lab Hematol*. 2020;42:685–96.
81. Smock KJ. The Role of ADAMTS13 Testing in the Work up of Suspected Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Clinical Laboratory News*. 2016; American Association of Clinical Chemistry.
82. 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*. 2010;50:1654–64.
83. Bendapudi PK, Hurwitz S, Fry A, Marques MB, Waldo SW, Li A, et al. Derivation and external validation of the PLASMIC score for rapid assessment of adults with thrombotic microangiopathies: A cohort study. *Lancet Haematol*. 2017;4(4):e157–64.
84. Grall M, Azoulay E, Galicier L, Provôt F, Wynckel A, Poullin P, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura misdiagnosed as autoimmune cytopenia: Causes of diagnostic errors and consequence on outcome. Experience of the French thrombotic microangiopathies reference Centre. *Am J Hematol*. 2017;92(4):381–7.
85. Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, Coppo P, Geldziler B, Iorio A, et al. ISTH guidelines for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2020;0–3:2486–95.
86. Sawler D, Parker A, Britto J, Goodyear MD, Sun HL. Time from suspected thrombotic thrombocytopenic purpura to initiation of plasma exchange and impact on survival: a 10-year provincial retrospective cohort study. *Thromb Res*. 2020;193:53–9.
87. Coppo P, Bubenheim M, Azoulay E, Galicier L, Malot S, Bigé N, et al. A regimen with caplacizumab, immunosuppression, and plasma exchange prevents unfavorable outcomes in immune-mediated TTP. *Blood*. 2021;137(6):733–42.
88. Dutt T, Shaw RJ, Stubbs MJ, Yong J, Bailiff B, Cranfield T, et al. Real-world evidence of caplacizumab use in the management of acute TTP. *Blood*. 2021;137(13):1731–40.
89. 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;40(1):104–11.
90. 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;118(7):1746–53.
91. Chen H, Fu A, Wang J, Wu T, Li Z, Tang J, et al. Rituximab as first-line treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Int Med Res*. 2017;45(3):1253–60.
92. Lim W, Vesely SK, George JN. Evidence-based focused review the role of rituximab in the management of patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2015;125(10):1526–31.
93. Crowley MP, McDonald V, Scully M. Ofatumumab for TTP in a patient with anaphylaxis associated with rituximab. *N Engl J Med*. 2018;378(1):92–3.
94. Jestin M, Benhamou Y, Schelpe AS, Roose E, Provôt F, Galicier L, et al. Preemptive rituximab prevents long-term relapses in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2018;132(20):2143–53.
95. Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, Mudde G, Wolf M, Coppo P, et al. Prognostic value of anti-ADAMTS13 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 ADAMTS13 activity. *Blood*. 2007;109(7):2815–22.
96. Page EE, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, Vesely SK, George JN. Rituximab reduces risk for relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2016;127(24):3092–4.
97. Sun L, Mack J, Li A, Ryu J, Upadhyay VA, Uhl L, et al. Predictors of relapse and efficacy of rituximab in immune thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv*. 2019;3(9):1512–8.
98. FDA. FDA approves first therapy for the treatment of adult patients with a rare blood clotting disorder [internet]. FDA News Release. 2019 [cited 2021 Jun 2]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resoures-information-approved-drugs/fda-approved-caplacizumab-yhdp>
99. Volker LA, Kaufeld J, Miesbach W, Brähler S, Reinhardt M, Kühne L, et al. Real-world data confirm the effectiveness of caplacizumab in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv*. 2020;4(13):3085–92.
100. Scully M, Cataland SR, Peyvandi F, Coppo P, Knöbl P, Kremer Hovinga JA, et al. Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 2019;380(4):335–46.
101. Goshua G, Sinha P, Hendrickson JE, Tormey CA, Pavan B, Lee A. Cost effectiveness of caplacizumab in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2021;137(7):969–76.
102. Picod A, Veyradier A, Coppo P. Should all patients with immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura receive caplacizumab? *J Thromb Haemost*. 2021;19(1):58–67.
103. Volker LA, Kaufeld J, Miesbach W, Brähler S, Reinhardt M, Kühne L, et al. ADAMTS13 and VWF activities guide individualized caplacizumab treatment in patients with aTTP. *Blood Adv*. 2020;4(13):3093–101.
104. Coppo P, Froissart A. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura beyond therapeutic plasma exchange. *Hematology*. 2015;637–43:637–43.
105. 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;93(2):232–9.
106. Deford CC, Reese JA, Schwartz LH, Perdue JJ, Hovinga JAK, Bernhard L, et al. Multiple major morbidities and increased mortality during long-term follow-up after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2013;122(12):2023–9.
107. George JN. TTP: long-term outcomes following recovery. *Hematol (United States)*. 2018;2018(1):548–52.
108. Prevel R, Roubaud-Baudron C, Gourlain S, Jamme M, Peres K, Benhamou Y, et al. Immune thrombotic thrombocytopenic purpura in older patients: prognosis and long-term survival. *Blood*. 2019;134(24):2209–17.
109. Sukumar S, Brodsky M, Hussain S, Yanek L, Moliterno A, Brodsky R, et al. Cardiovascular disease is a leading cause of mortality among TTP survivors in clinical remission. *Blood Adv*. 2021;bloodadvances.2020004169.



110. Upreti H, Kasmani J, Dane K, Braunstein EM, Streiff MB, Shanbhag S, et al. Reduced ADAMTS13 activity during TTP remission is associated with stroke in TTP survivors. *Blood*. 2019;134(13):1037–45.
111. Sakai K, Fujimura Y, Nagata Y, Higasa S, Moriyama M, Isonishi A, et al. Success and limitations of plasma treatment in pregnant women with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2020;18(11):2929–41.
112. Chakravarty EF, Murray ER, Kelman A, Farmer P. Pregnancy outcomes after maternal exposure to rituximab. *Blood*. 2011;117(5):1499–506.
113. Ferrari B, Peyvandi F. How I treat thrombotic thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Blood*. 2020;136(19):2125–32.
114. Schiviz A, Wuersch K, Piskernik C, Dietrich B, Hoellriegel W, Rottensteiner H, et al. A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood*. 2012;119(25):6128–35.
115. Van DHA, Taleghani MM, Sakai K, Friedman KD, George JN, Hrachovinova I, et al. The international hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura registry: Key findings at enrollment until 2017. *Haematologica*. 2019;104(10):2107–15.
116. 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;81(1):8–13.
117. Taylor A, Vendramin C, Oosterholt S, Della Pasqua O, Scully M. Pharmacokinetics of plasma infusion in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2019;17(1):88–98.
118. Alwan F, Vendramin C, Liesner R, Clark A, Lester W, Dutt T, et al. Characterization and treatment of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2019;133(15):1644–51.
119. Kremer Hovinga JA, Braschler TR, Buchkremer F, Farese S, Hengartner H, Lovey PY, et al. Insights from the hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura registry: discussion of key findings based on individual cases from Switzerland. *Hämostaseologie*. 2020;40:S5–14.
120. Sakai K, Fujimura Y, Miyata T, Isonishi A, Kokame K, Matsumoto M. Current prophylactic plasma infusion protocols do not adequately prevent long-term cumulative organ damage in the Japanese congenital thrombotic thrombocytopenic purpura cohort. *Br J Haematol*. 2021;194(2):444–52.
121. Scully M. Hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2019;104(10):1916–8.
122. Scully M. How an engineered therapy could replace the need for potentially harmful plasma infusions. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2019;12(4):289–91.
123. 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*. 2011;9:936–44.
124. Plaimauer B, Schiviz A, Kaufmann S, Höllriegel W, Rottensteiner H, Scheiflinger F. Neutralization of inhibitory antibodies and restoration of therapeutic ADAMTS-13 activity levels in inhibitor-treated rats by the use of defined doses of recombinant ADAMTS-13. *J Thromb Haemost*. 2015;13(11):2053–62.
125. Tersteeg C, Schiviz A, De Meyer SF, Plaimauer B, Scheiflinger F, Rottensteiner H, et al. Potential for recombinant ADAMTS13 as an effective therapy for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2336–42.
126. Zhou W, Dong L, Ginsburg D, Bouhdssira EE, Tsai HM. Enzymatically active ADAMTS13 variants are not inhibited by anti-ADAMTS13 autoantibodies: a novel therapeutic strategy? *J Biol Chem*. 2005;280(48):39934–41.
127. Ercig B, Graça NAG, Kangro K, Arfman T, Wichapong K, Hrdinova J, et al. N-glycan mediated shielding of ADAMTS13 prevents binding of pathogenic autoantibodies in immune-mediated TTP. N-glycan mediated shielding of ADAMTS13 prevents binding of pathogenic autoantibodies in immune-mediated TTP. *Blood*. 2021;137(19):2694–8.
128. Scully M. Transforming the major autoantibody site on ADAMTS13: spacer domain variants retaining von Willebrand factor cleavage activity. *Haematologica*. 2020;105(11):2510–2.
129. Miyata T. Autoantibody-resistant ADAMTS13 variant. *Blood*. 2021;137(19):2575–6.
130. George JN. TTP: the evolution of clinical practice. *Blood*. 2021;137(6):719–20.
131. McMinn JR, Thomas IA, Terrell DR, Duvall D, Vesely SK, George JN. Complications of plasma exchange in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: a study of 78 additional patients. *Transfusion*. 2003;43:415–9.
132. Völker LA, Brinkkoetter PT, Knöbl PN, Krstic M, Kaufeld J, Menne J, et al. Treatment of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura without plasma exchange in selected patients under caplacizumab. *J Thromb Haemost*. 2020;18(11):3061–6.
133. Stubbs MJ, Low R, McGuckin S, Newton R, Thomas M, Westwood JP, et al. Comparison of rituximab originator (MabThera) to bio-similar (Truxima) in patients with immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2019;185(5):912–7.
134. Delrue M, Baylatry MT, Joly AC, Corre E, Marjanovic Z, El-Khoury-Hanna N, et al. Efficacy of subcutaneous preemptive rituximab in immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura: Experience from the first 12 cases. *Am J Hematol*. 2021;96(1):E26–9.
135. Morel T, Cano SJ. Measuring what matters to rare disease patients – reflections on the work by the IRDiRC taskforce on patient-centered outcome measures. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12:1–13.
136. Lewis QF, Lanneau MS, Mathias SD, Terrell DR, Vesely SK, George JN. Long-term deficits in health-related quality of life after recovery from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*. 2009;49:118–24.
137. Cataland SR, Scully MA, Paskavitz J, Maruff P, Witkoff L, Jin M, et al. Evidence of persistent neurologic injury following thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*. 2011;86(1):87–9.
138. Riva S, Mancini I, Maino A, Ferrari B, Artoni A, Agosti P, et al. Long-term neuropsychological sequelae, emotional wellbeing and quality of life in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica*. 2020;105(7):1957–62.
139. Vesely SK. Life after acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: morbidity, mortality, and risks during pregnancy. *J Thromb Haemost*. 2015;13:216–22.
140. Chaturvedi S, Oluwole O, Cataland S, McCrae KR. Post-traumatic stress disorder and depression in survivors of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res*. 2017;151:51–6.
141. Falter T, Bösch S, Schepers M, Beutel M, Lackner K, Scharrer I, et al. Influence of personality, resilience and life conditions on depression and anxiety in 104 patients having survived acute autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Med*. 2021;10(2):365.
142. Oladapo AO, Ito D, Hibbard C, Bean SE, Krupnick RN, Ewenstein BM. Patient experience with congenital (hereditary) thrombotic thrombocytopenic purpura: a conceptual framework of symptoms and impacts. *Patient - Patient-Centered Outcomes Res*. 2019;12(5):503–12.
143. Bongers TN, Bruijne ELE de, Dippel DWJ, Jong AJ de, Deckers JW, Poldermans D, et al. Lower levels of ADAMTS13 are associated with cardiovascular disease in young patients. *Atherosclerosis*. 2009;207:250–4.
144. Dichgans M, Leys D. Vascular cognitive impairment. *Circ Res*. 2017;120(3):573–91.
145. Alwan F, Mahdi D, Tayabali S, Cipolotti L, Lakey G, Hyare H, et al. Cerebral MRI findings predict the risk of cognitive impairment in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2020;191(5):868–74.
146. Pereira LCV, Ercig B, Kangro K, Jamme M, Malot S, Galicier L, et al. Understanding the health literacy in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *HemaSphere*. 2020;4(4):e462.

147. Ambadwar P, Duvall D, Wolf NJ, Terrell DR, Vesely SK, George JN. Support groups for patients who have recovered from thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Apher.* 2008;23:168–9.
148. Roose E, Schelpe AS, Joly BS, Peetermans M, Verhamme P, Voorberg J, et al. An open conformation of ADAMTS-13 is a hallmark of acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2018;16(2):378–88.
149. Roose E, Schelpe AS, Tellier E, Sinkovits G, Joly BS, Dekimpe C, et al. Open ADAMTS13, induced by antibodies, is a biomarker for subclinical immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2020;136(3):353–61.
150. Roose E, Veyradier A, Vanhoorelbeke K. Insights into ADAMTS13 structure: impact on thrombotic thrombocytopenic purpura diagnosis and management. *Curr Opin Hematol.* 2020;27(5):320–6.
151. Sadeqi Nezhad M, Seifalian A, Bagheri N, Yaghoubi S, Karimi MH, Adbollahpour-Alitappeh M. Chimeric antigen receptor based therapy as a potential approach in autoimmune diseases: How close are we to the treatment? *Front Immunol.* 2020;11:1–12.
152. Liu-Chen S, Connolly B, Cheng L, Subramanian RR, Han Z. mRNA treatment produces sustained expression of enzymatically active human ADAMTS13 in mice. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–9.
153. 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.* 2009;17(1):34–41.
154. Jin S, Xiao J, Bao J, Zhou S, Wright JF, Zheng XL. AAV-mediated expression of an ADAMTS13 variant prevents shigatoxin-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2013;121(19):3825–9.
155. 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;113(10):2172–80.
156. Verhenne S, Vandeputte N, Pareyn I, Izsvák Z, Rottensteiner H, Deckmyn H, et al. Long-term prevention of congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in ADAMTS13 knockout mice by sleeping beauty transposon-mediated gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:836–44.
157. Zheng L, Abdelgawwad MS, Zhang D, Xu L, Wei S, Cao W, et al. Histone-induced thrombotic thrombocytopenic purpura in *adamts13*<sup>-/-</sup> zebrafish depends on von Willebrand factor. *Haematologica.* 2020;105(4):1107–19.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

**How to cite this article:** Graça NA, Joly BS, Voorberg J, Vanhoorelbeke K, Béranger N, Veyradier A, Coppo P. TTP: From empiricism for an enigmatic disease to targeted molecular therapies. *Br J Haematol.* 2022;197:156–170. <https://doi.org/10.1111/bjh.18040>