

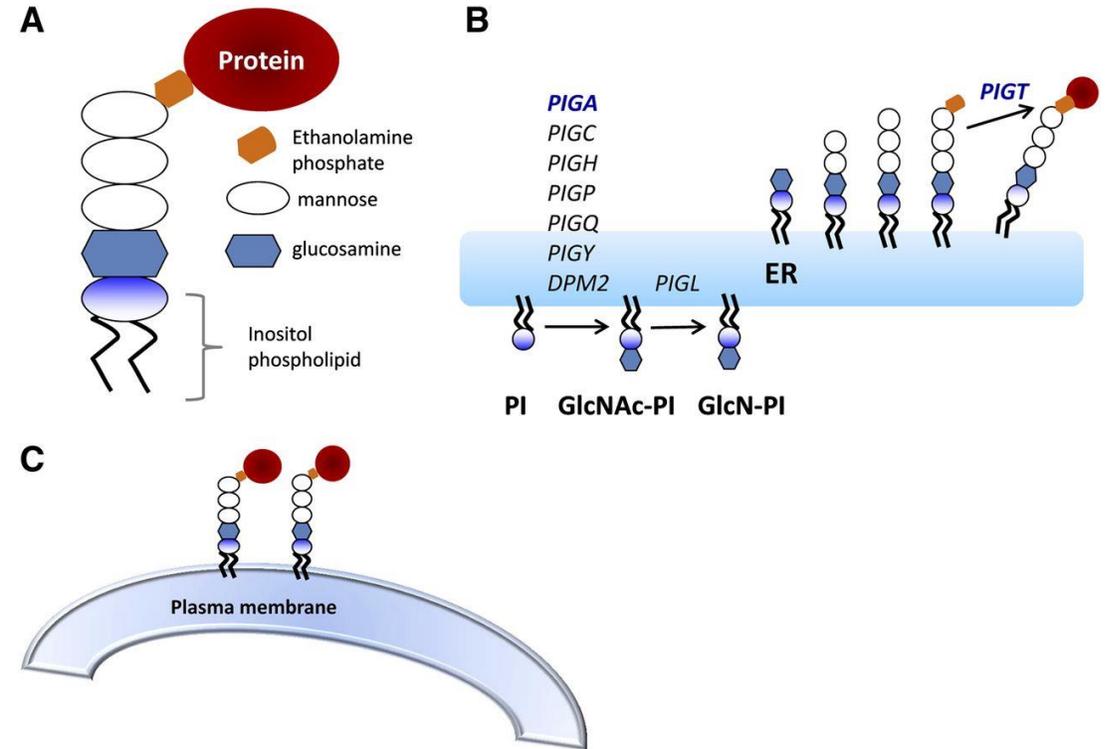
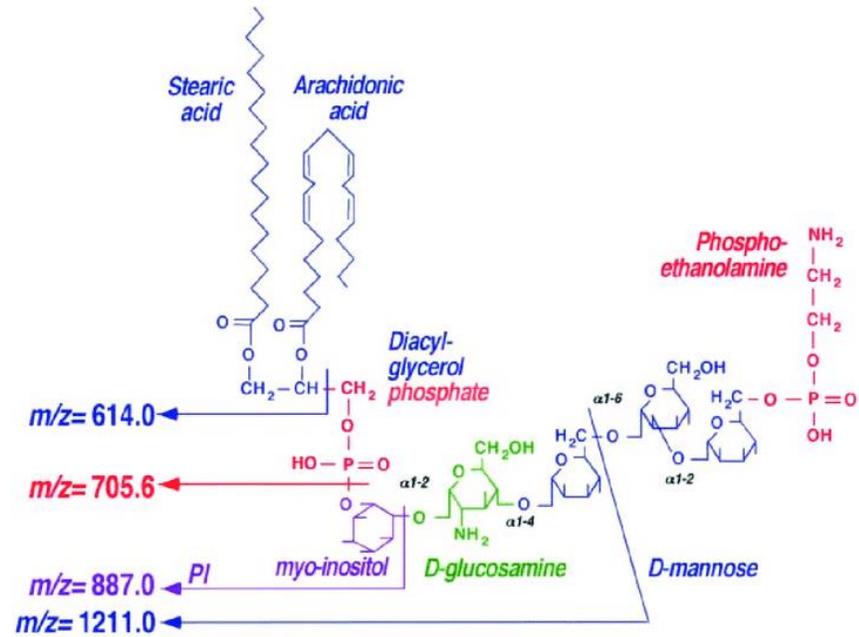
L'HÉMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE, QUAND LE COMPLÉMENT DÉTRUIT LES GLOBULES ROUGES...

Pr Marc Vasse
UEL 343

HISTORIQUE

- 1882 : description d'une pathologie avec hémoglobinurie et hémolyse intravasculaire
- 1911 : 1^{ère} description du tableau clinique par Marchiafava et Nazari, complétée en 1931 par Micheli
- Fréquence : 0,1/100 000/an
- Fréquence des épisodes thromboemboliques
- Sensibilité anormale des hématies à l'action du complément
- 1980 : déficit en DAF (*Decay accelerating Factor*) et en MIRL (*Membrane inhibitor of reactive lysis*)
- Déficiences d'autres molécules ont été identifiées
- Toutes les protéines déficitaires sont fixées à la membrane par un Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)
- Anomalie au niveau du gène *PIG-A*
- Anomalie au niveau de la cellule souche, les cellules souches GPI mutées auraient un avantage de survie

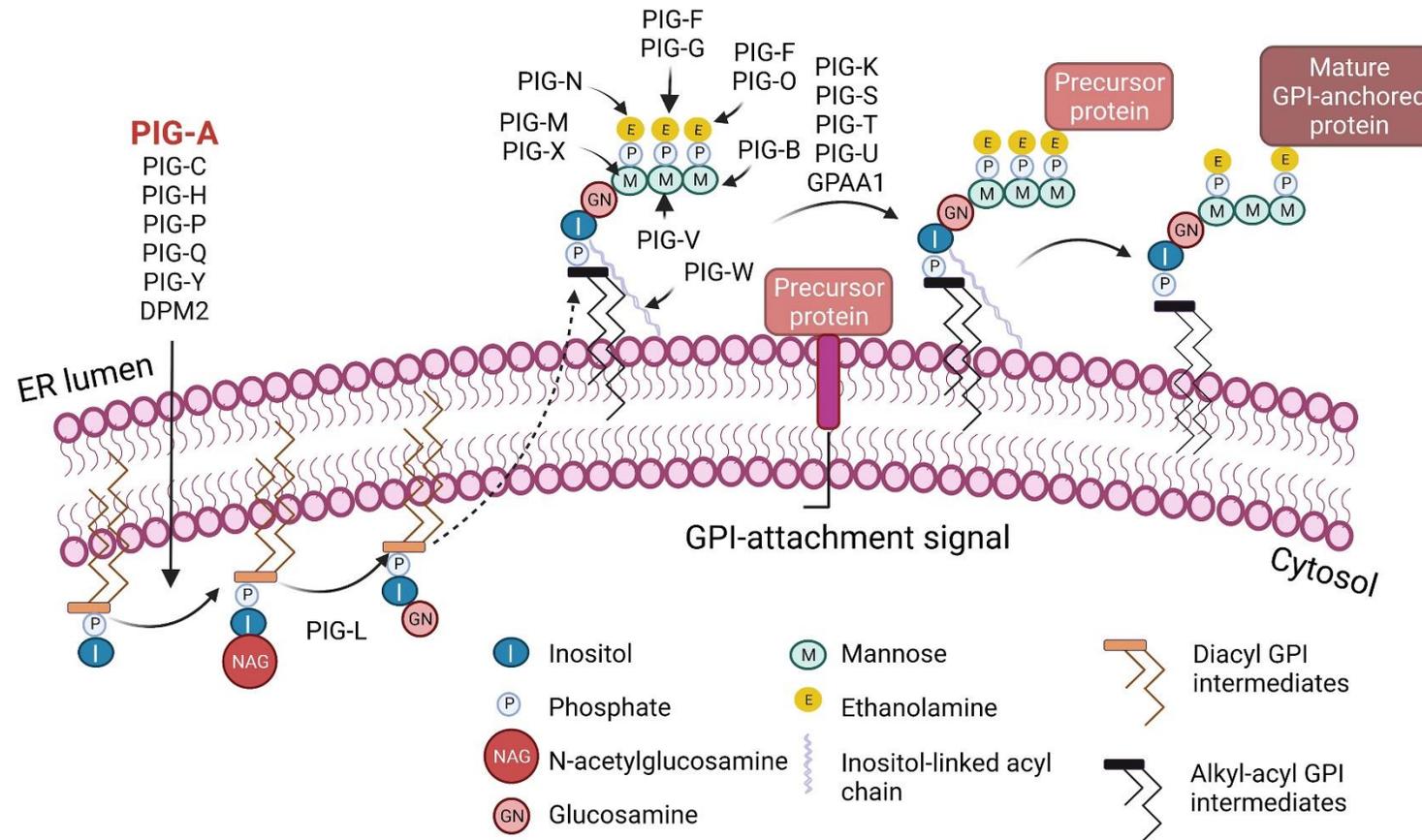
LE GLYCOSYL-PHOSPHATIDYL-INOSITOL (GPI) ET L'ANCRAGE DES PROTEINES



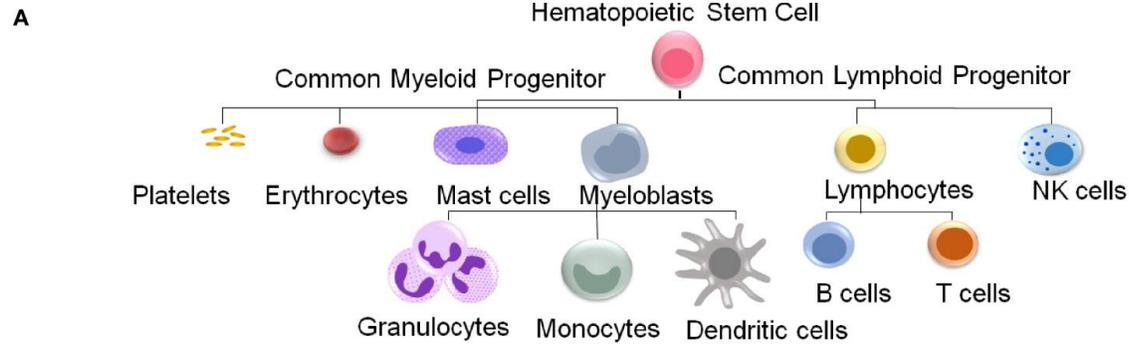
(Robert A. Brodsky, Blood, 2014)

SYNTHESE DES PROTEINES GPI-ANCRES

- > 12 protéines GPI-ancrées présentes à la surface des cellules souches



EXPRESSION DIFFERENCIEE DES PROTEINES GPI-ANCREES A LA SURFACE DES CELLULES SANGUINES



B Human

PB	PB	PB	PB	PB	PB	PB
Progenitor cells	Granulocytes	Monocytes	Dendritic cells	B-cells	T-cells	NK cells
CD59	FCGR3B	CD14	CD48	CD52	CD52	CD160
CD55	TNFRSF10C	PLAUR	CD55	CD55	CD48	CD48
BST2	VNN2	CD48	LY6E	CD48	CD55	LY6E
LY6E	CD55	CD55	PLAUR	LY6E	LY6E	CD52
TFPI	ALPL	BST1	CD52	CD24	PRNP	PRNP
CD52	PLAUR	LY6E	CD14	CD14	VNN2	CD55
PRNP	LY6E	VNN2	PRNP	VNN2	BST2	NCAM1
DPEP2	DPEP2	PRNP	BST2	PRNP	NT5E	FCGR3B
CD14	BST1	BST1	CD52	BST2	DPEP2	BST2
BST1	BST1	CD52	DPEP2	NT5E	CD59	VNN2
VNN2	CA4	DPEP2	CPM	CD59	RECK	DPEP2
CD48	CD52	CPM	VNN2	DPEP2	CD160	CD59
PLAUR	BST2	VNN1	PLAUR	PLAUR	FCGR3B	EFNA5
EFNA1	CD48	FOLR2	VNN1	BST1	RGMB	RECK
CD109	CD59	VNN1	EFNA4	EFNA4	LYPD3	
PRSS21	CD177	TNFRSF10C	ALPL	CPM		
DPEP3	MMP25	HYAL2				
EFNA4	VNN1	FCGR3B				
NEGR1	DPEP3	EFNA4				
	PRNP	LYPD2				
	TEX101	ITLN1				
	LYPD6B	LYNX1				
	SEMA7A					
	PRSS21					

C Mouse

BM	PB	PB	spleen	spleen	spleen & LN	spleen
Progenitor cells	Granulocytes	Monocytes	Dendritic cells	B-cells	T-cells	NK cells
Ly6e	Alpl2	Rtn4r	Car4	Ly6g6c	Nrn1	Vcn1
Cd48	Rtn4r	Alpl2	Mmp19	Mdga2	Gpc5	Ncam1
Bst2	Mmp19	Folr2	Ly6g6c	Art2b	Lypd6	Cd109
Cd52	Gpc4	Ly6c2	Gpc5	Gp2	Cdh13	Hyal5
Ly6c2	NT5e	Vcam1	Cntn1	Prnp	Mill2	Folr1
Mdga1	Lypd6b	NT5e	Folr2	Prss30	Prss21	Msln
Ly6a	Efn1	Akp3	Raet1e			Izumo1r
Gpc1	Negr1	Ly6c	Lypd8	Bst1	Gas1	Gpc2
Hyal2	Akp3	Mmp19	Msln	Ly6a	Ly6f	Art1
Rtn4r	Art3	Smpd3b	Cntn3	Folr1	H60c	Cntn4
Ache	Folr2	Rgma	Vtn1	Itln1	Dpep2	Alpl2
Art4	Span1	Lypd6b	Ncam2	Smpd3b	Ncam1	Lypd3
Cd59a	Gfra3	Lyx1	Nrn11	Vcam1	Pn	
Plaur	Vcam1	Gpc4	Cd52	Art4	Bst2	
Cd55	Smpd3b	Lypd1	Ly6i	Ly6k	Cd14	
Thy1	Ly6f	Tnfrsf23	Ncam1	Reck	Alpl	
Ntng2			Ly6d	Alpl	Tdgl	
Ly6d			Efn1	Ntm	Sema7a	
Gfra1			Cntn1		Rgma	
Gfra2			Ache		Lypd2	
Lyx1			Lyx1			
Rtn4r			Vcam1			
Efn1			Efn1			
Gpc2			Cd160			
Sema7a			Gp2			
Prnp			Enpp6			
Bst1			Ly6k			

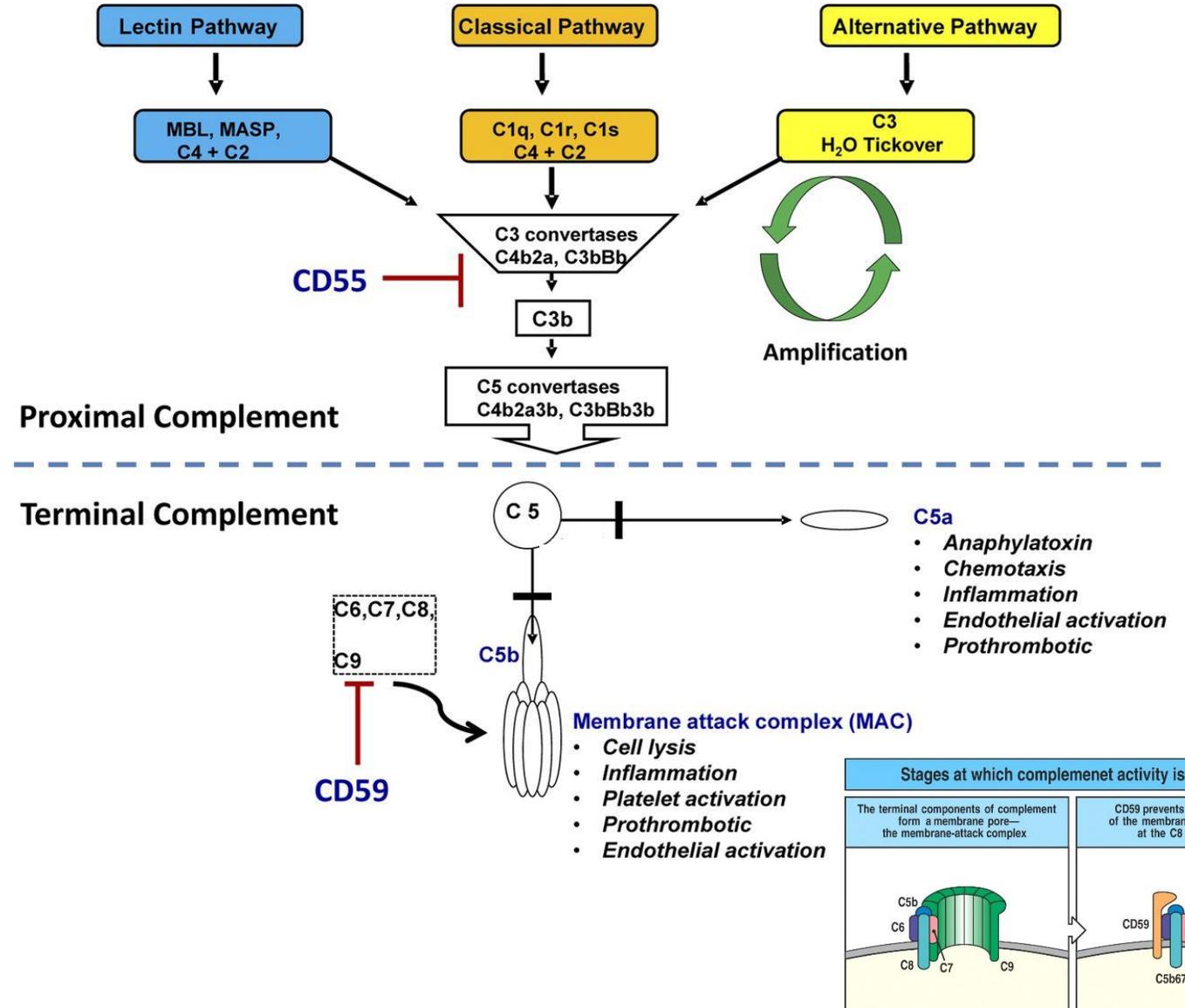
PROTEINES GPI-ANCRES ET COMPLÉMENT

➤ CD 55 : DAF (*Decay accelerating Factor*)

- Glycoprotéine de 68kDA
- Accélère la dégradation de la C3 convertase à la surface des membranes
- Récepteur aux virus coxackies et certains entérovirus

➤ CD 59

- Glycoprotéine de 19 kDA
- Interaction directe avec le complexe d'attaque membranaire du complément
- Présent également à la surface du VIH ou du CMV



SYMPTOMATOLOGIE

➤ La forme « classique »

- Sujet jeune (30 – 40 ans)
- Fatigue, malaise, ictère modéré, ± dysphagie, douleurs abdominales, troubles de l'érection (35%)
- Anémie isolée, hémoglobinurie (+ souvent le matin)
- Hémolyse majorée par infections, chirurgie, activité physique intense, absorption d'alcool
- Sensibilité accrue aux infections (voies respiratoires, infections pulmonaires), 2^{ème} cause de mortalité
- Insuffisance rénale possible (hémosidérose chronique, thromboses capillaires)
- Thromboses (1^{ère} cause de mortalité), 40 % des patients, veines sus-hépatiques (Budd-Chiari et AVC ischémiques, age de survenue 45 ans, récurrences même sous anticoagulants. Thromboses fréquentes au cours de la grossesse, 20 % de mortalité
- Evolution vers un syndrome myélodysplasique (5 %) ou leucémie myéloïde aiguë (2,5 %)

SYMPTOMATOLOGIE

➤ La forme anaplasique

- Clone faible de « cellules HPN » (< 10 %)
- Cytopénies variablement associées (neutropénies, thrombopénies)
- Tableau clinique dominé par l'insuffisance médullaire

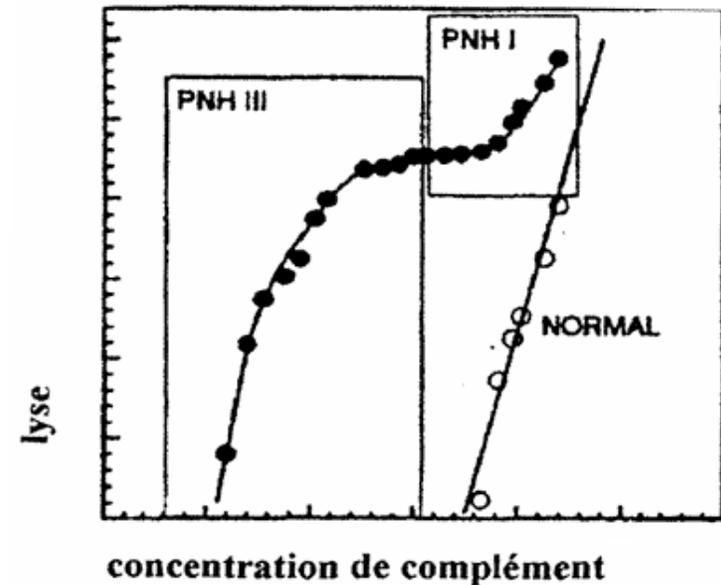
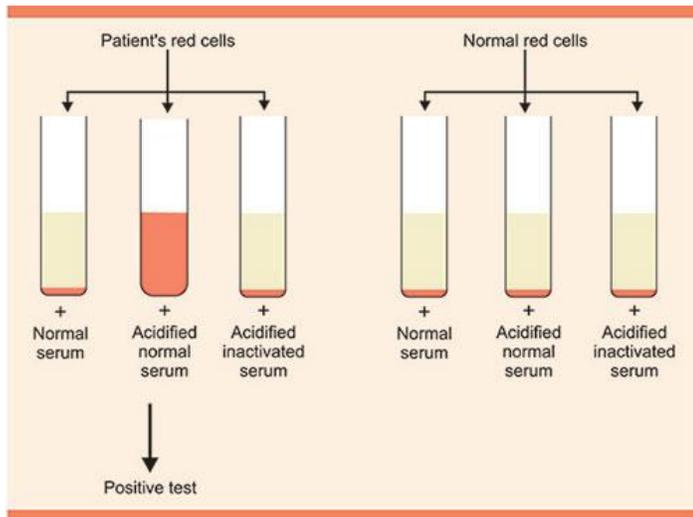
➤ La forme « subclinique »

- Clone HPN < 1%
- En association avec les syndromes myélodysplasique (SMD) de faible risque (20 % des cas). Ces SMD évoluent rarement vers une LAM, et répondent à la ciclosporine

DIAGNOSTIC

➤ Le test de Ham & Dacie et test au sucrose (obsolètes)

- Test d'hémolyse (> 10 %) en présence de sérum acidifié, absence d'hémolyse quand le sérum à été chauffé

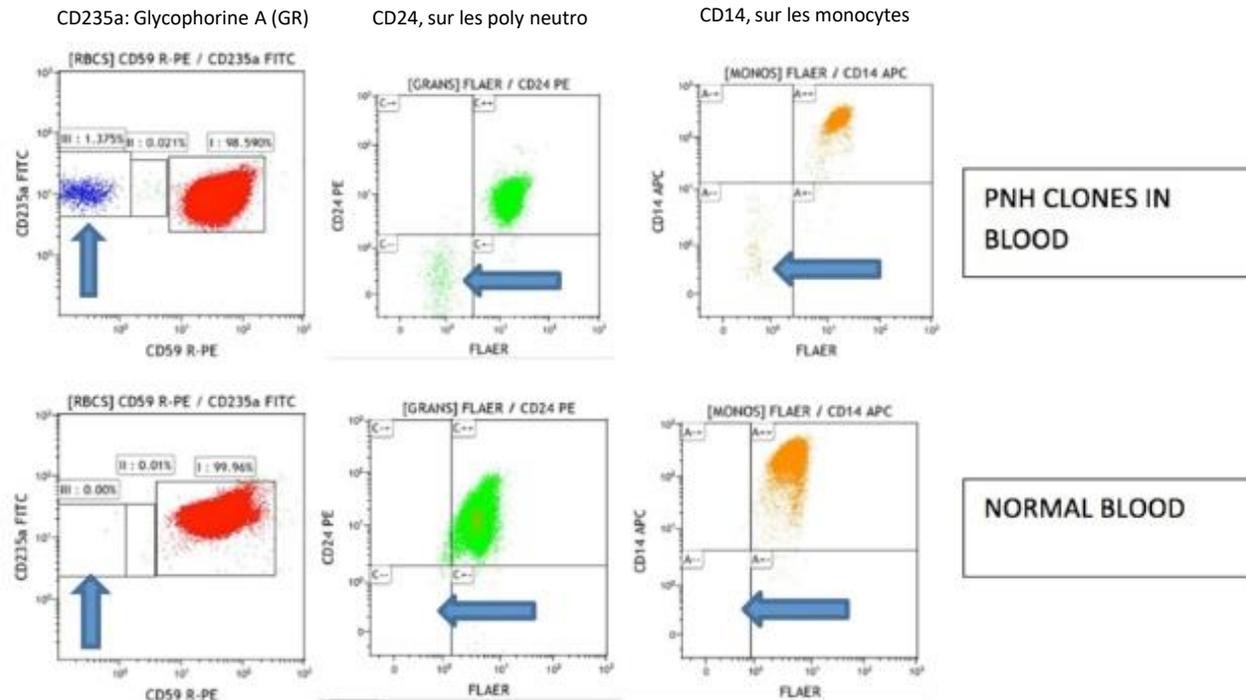


- Hémolyse accrue quand faible force osmotique (sucrose)

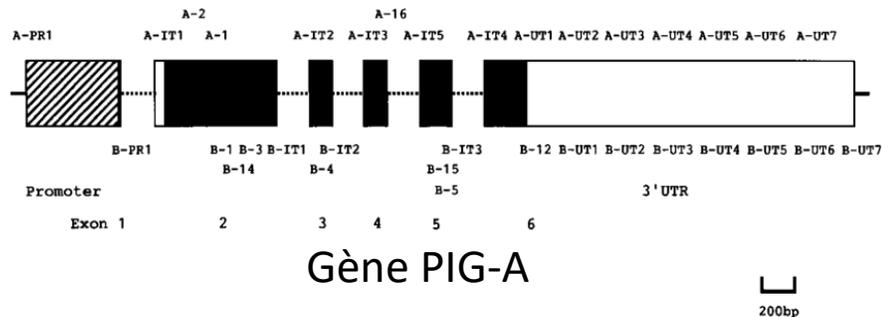
DIAGNOSTIC

➤ La cytométrie en flux

- Plusieurs marqueurs GPI ancrés doivent être utilisés,
- FLAER (fluorescent aerolysin, se fixe sur les GPI)
- Etudes sur plusieurs lignées (hématies, neutrophiles, monocytes) du sang périphérique
- Permet de quantifier le clone



ORIGINE GÉNÉTIQUE DE LA PERTE DES PROTÉINES GPI-ANCRÉES



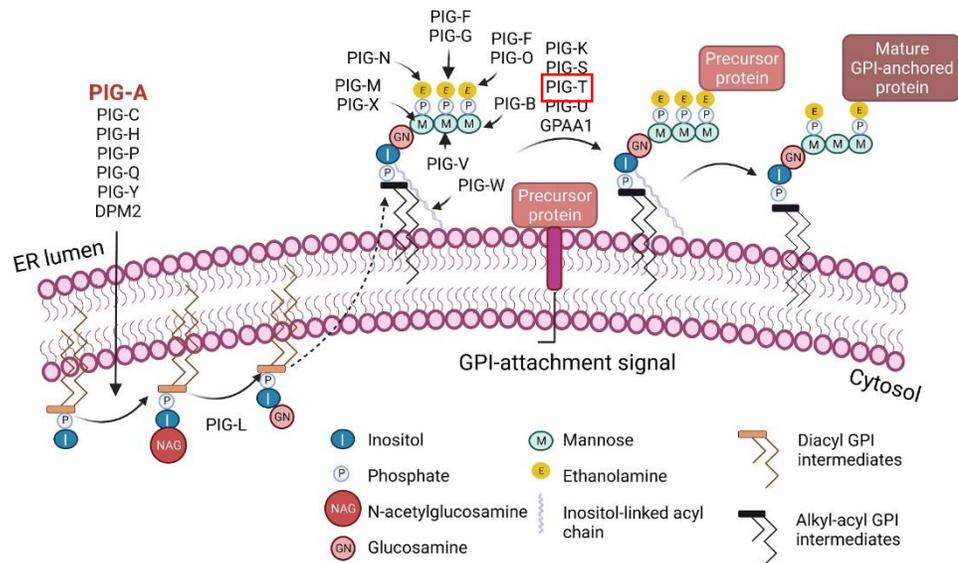
- Mutation acquise au niveau des cellules souches dans le gène *PIG-A*
- La mutation au niveau des cellules germinales est létale
- Situé sur le chromosome X (Xp22), 16 kb, code une protéine de 60 kDa
- Majorité des mutations associées à l'HPN sont présentes dans l'exon 2 (petites insertions ou délétions), quelques mutations non-sens.
- Pas de « hot-spot »
- Mutation sera retrouvée dans toutes les cellules sanguines, possiblement les cellules endothéliales
- Biologie moléculaire pas faite en routine (CFX suffisante)

ORIGINE GÉNÉTIQUE DE LA PERTE DES PROTÉINES GPI-ANCRÉES

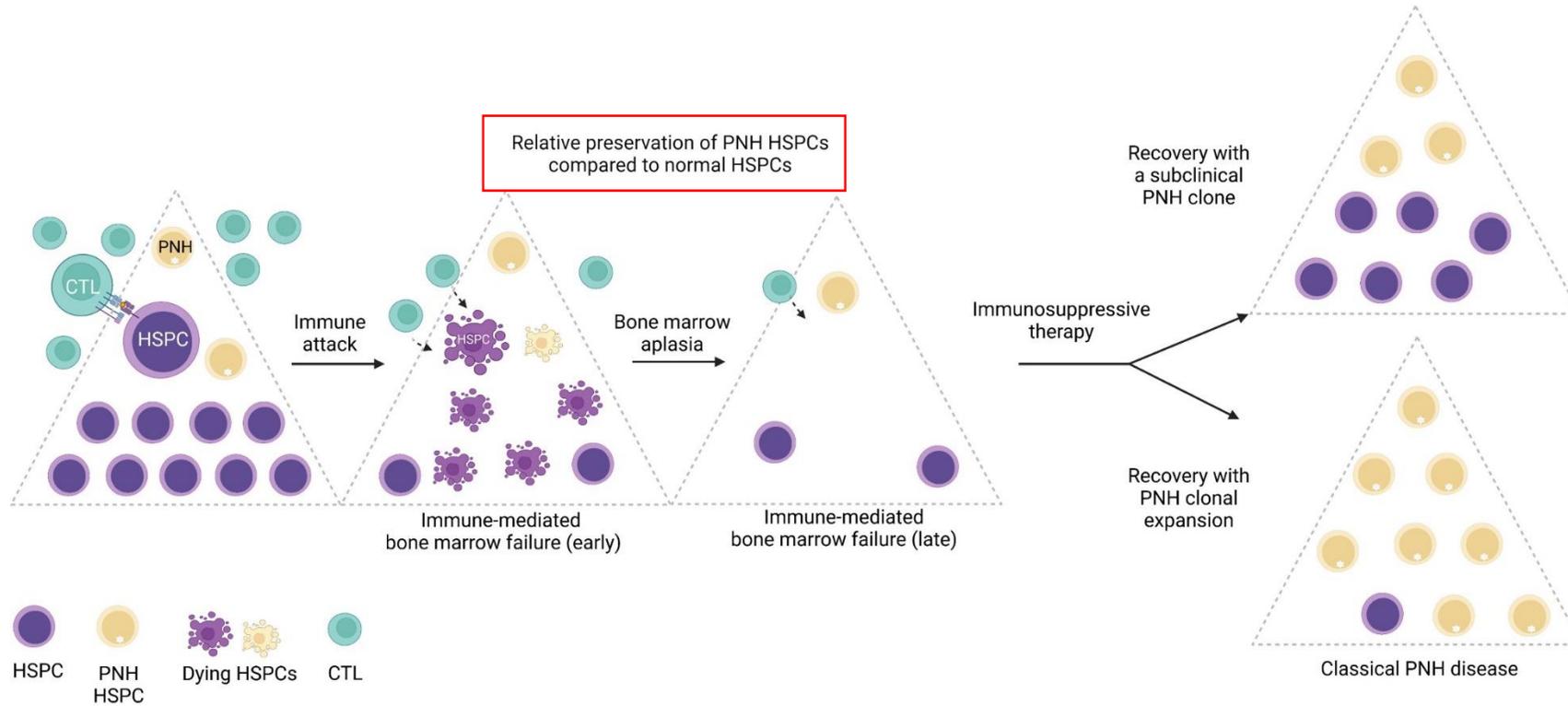
- Pas de mutation dans les autres gènes PIG associée à l'HPN

➤ Mutation germinale dans le gène du CD59

- Syndrome type HPN (hémolyse chronique et thromboses) **et** des neuropathies périphériques
- CD59 absent de TOUTES les cellules de l'organisme
- Mutation dans *PIG-T* décrite
- La démyélinisation est due à une attaque des nerfs par le complément



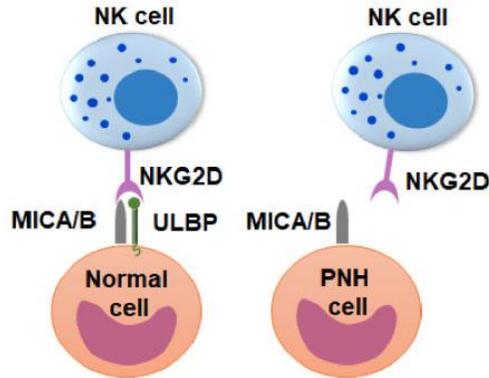
L'HPN, UNE PATHOLOGIE AUTO-IMMUNE ?



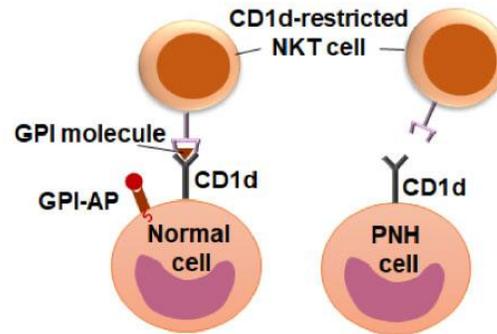
HSCP: cellule souche; CTL : lymphocyte cytotoxique;

COMMENT LES CELLULES SOUCHES GPI (-) ECHAPPENT AU SYSTÈME IMMUNITAIRE ?

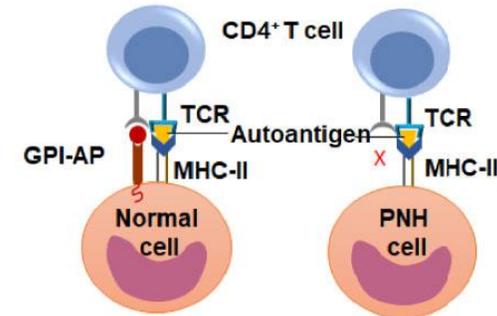
A Immunoselection by NK cells



B Immunoselection by CD1d-restricted immune attack against GPI

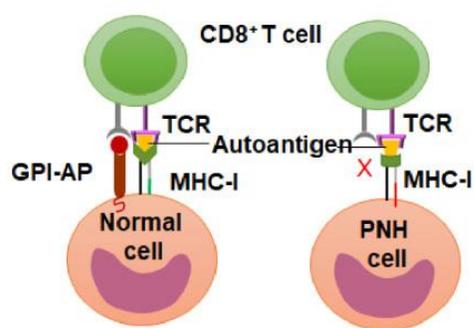


C Immunoselection by CD4+ T cell-mediated autoimmunity

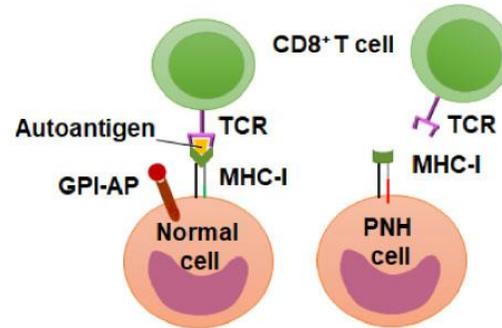


Loss of costimulatory molecule

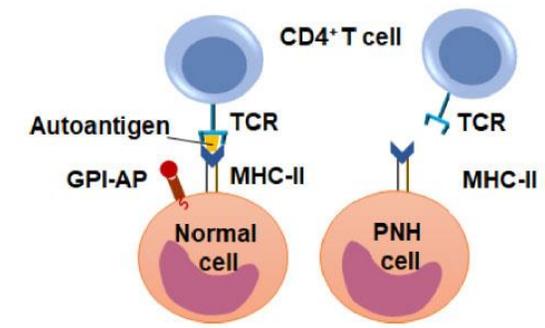
D Immunoselection by CD8+ T cell-mediated autoimmunity



Loss of costimulatory molecule

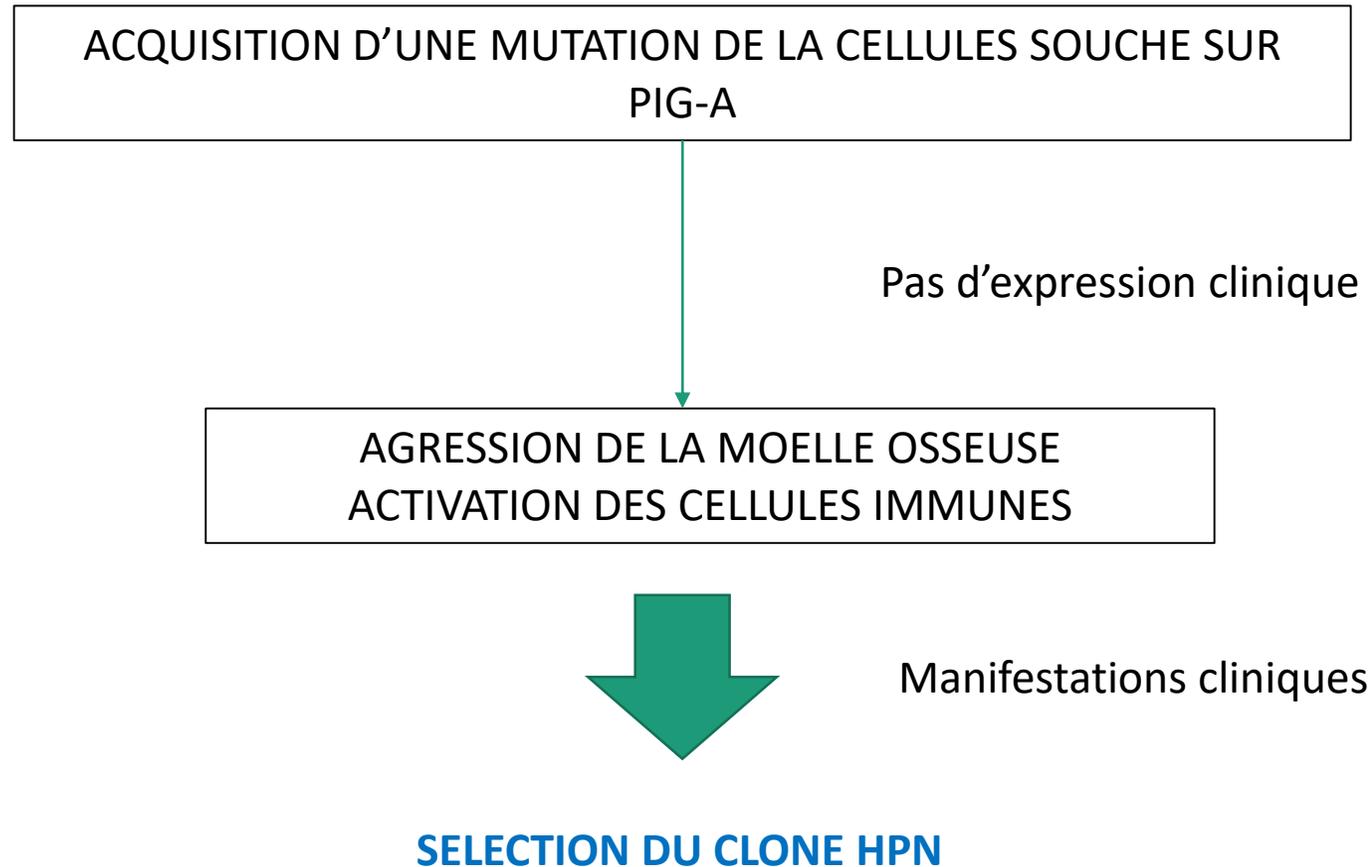


Defective MHC class I autoantigen presentation



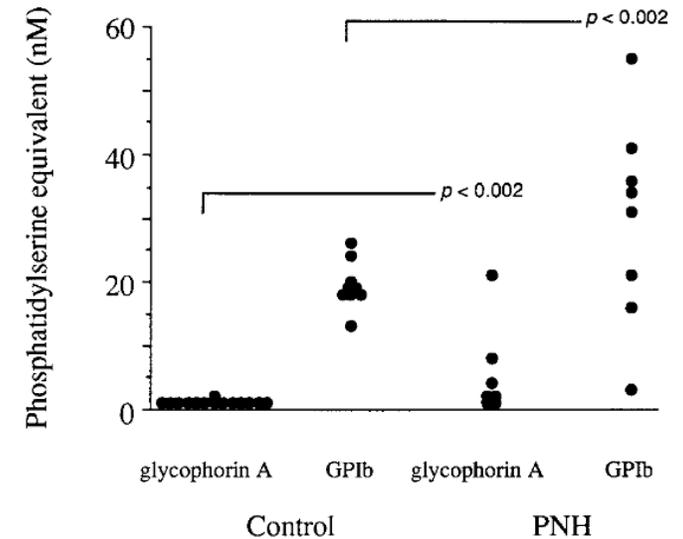
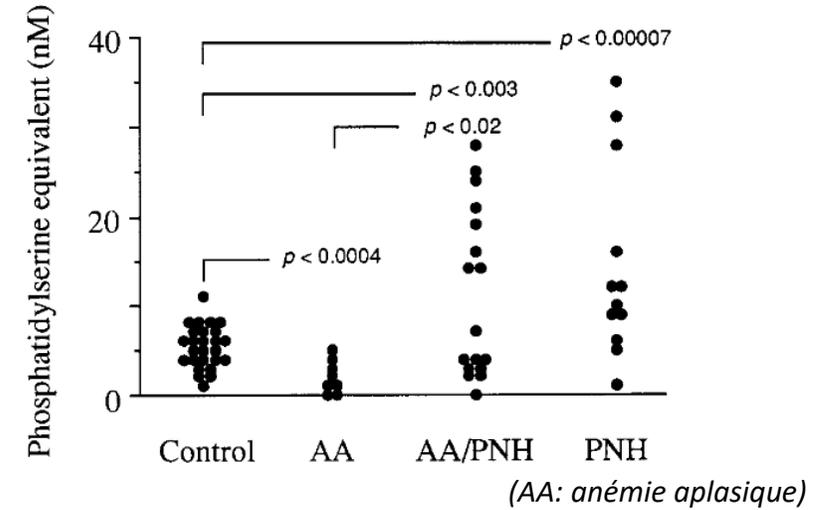
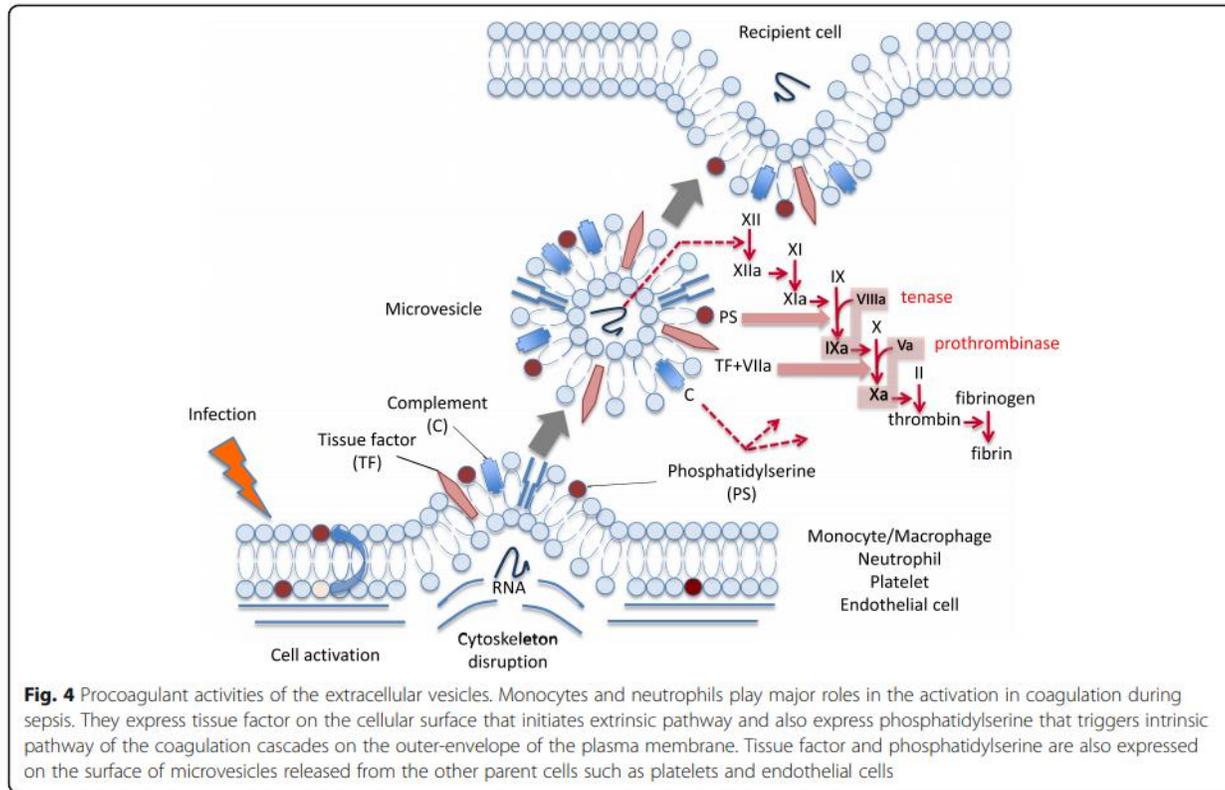
Defective MHC class II autoantigen presentation

L'HPN, UNE PATHOLOGIE EN 2 ETAPES



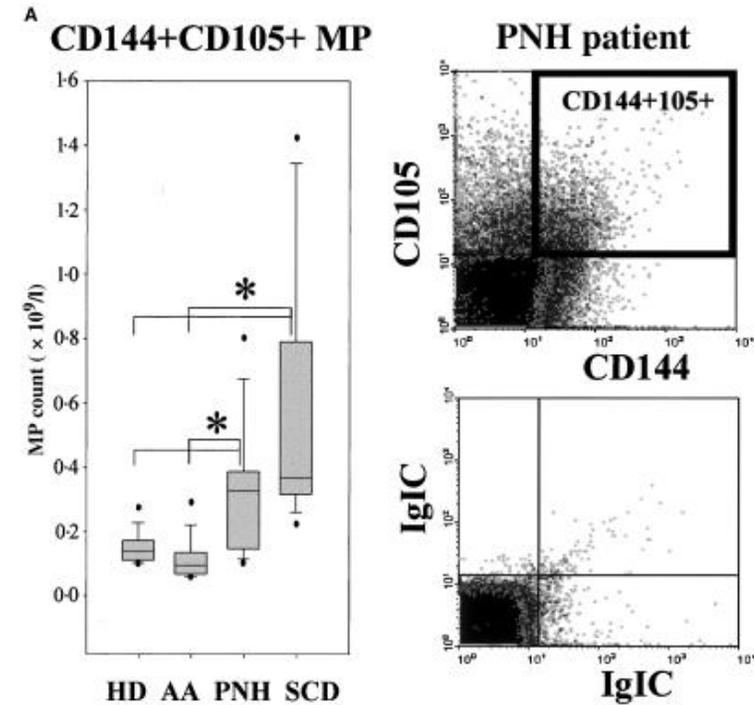
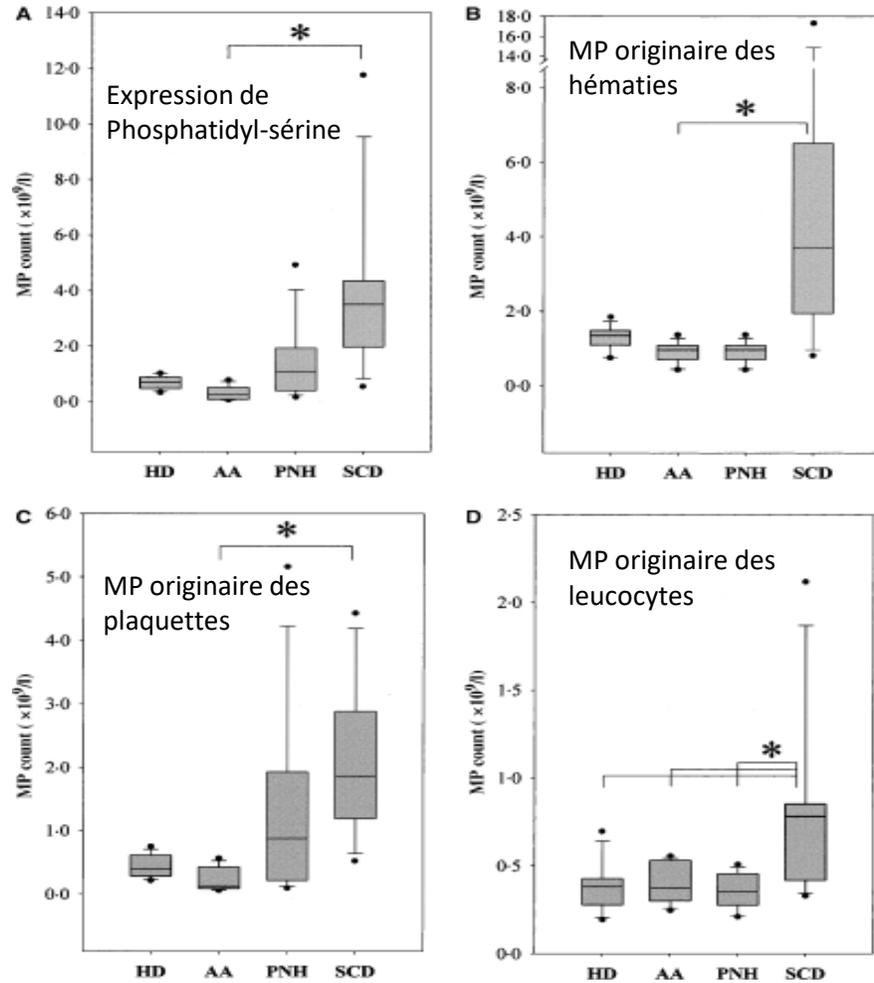
HPN ET THROMBOSE

- Augmentation des microparticules plaquettaires



(Blood. 1999;93:3451)

HPN ET MICROPATICULES



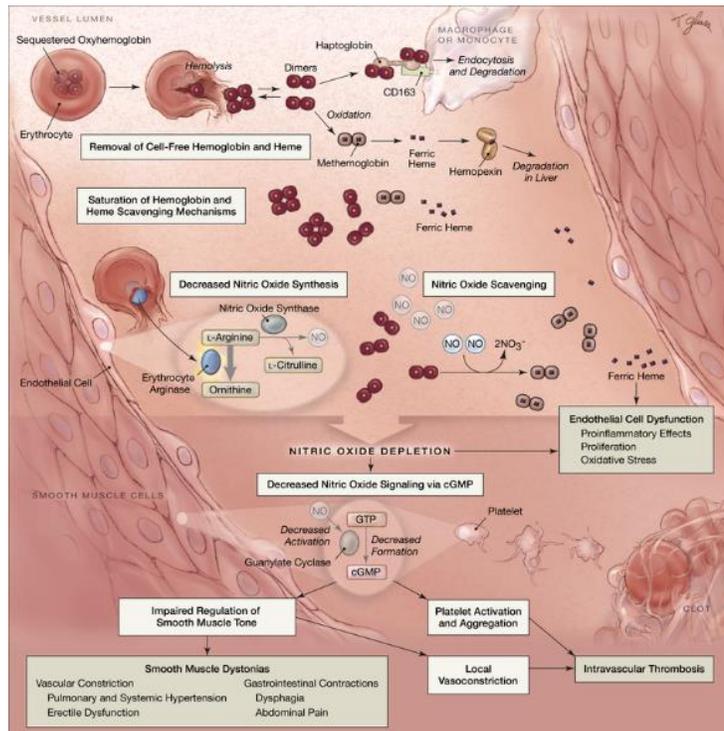
Microparticules dérivées de l'endothélium

(HD: sujets sains; AA: anémie aplasique; SCD: drépanocytaires)

(Br J Haemato. 2004, 125, 804–813)

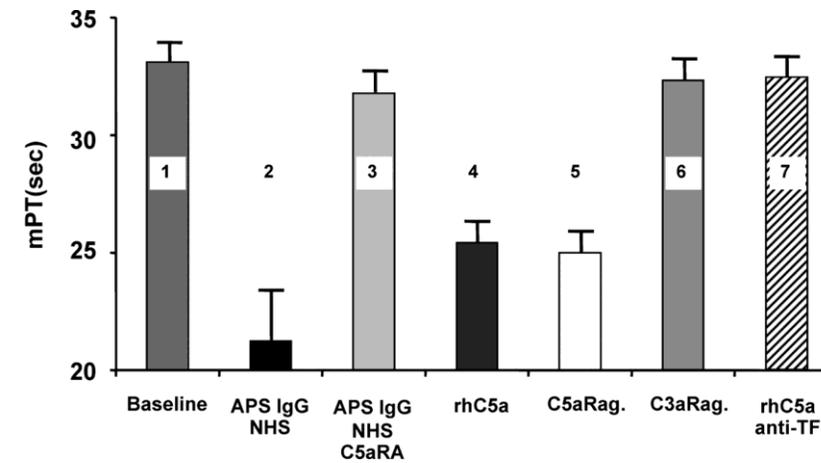
HPN ET THROMBOSE: AUTRES MÉCANISMES

- L'hémoglobine libre capture le NO



(JAMA. 2005;293(13):1653-1662)

- Le C5a induit l'expression de Facteur Tissulaire sur les polynucléaires neutrophiles

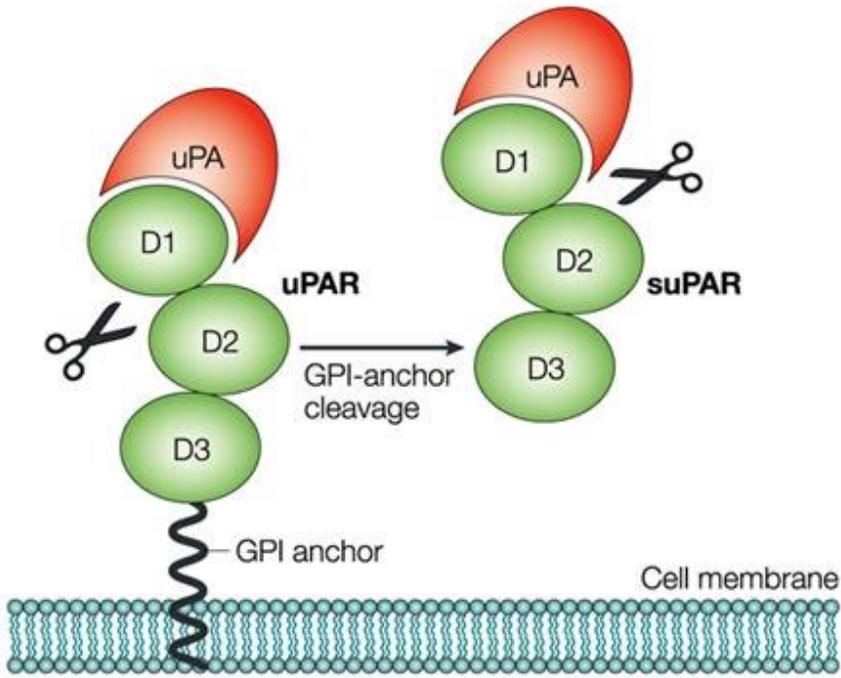
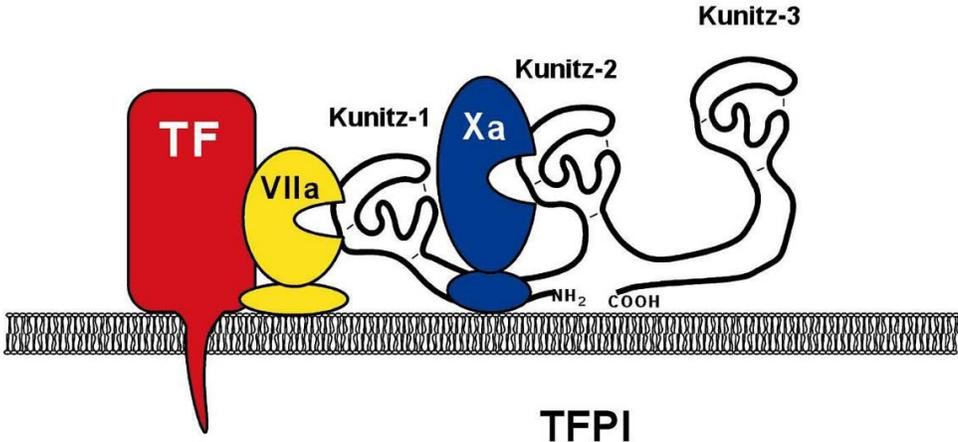


(J Immunol (2006) 177 (7): 4794–480)

- APS: syndromes des anti-phospholipides
- Rh C5a : C5a recombinant
- C5aRA : antagoniste du récepteur au C5a
- C5aRag : agoniste du récepteur au C5a
- C3aRag : agoniste du récepteur au C3a

- Le C5a induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires

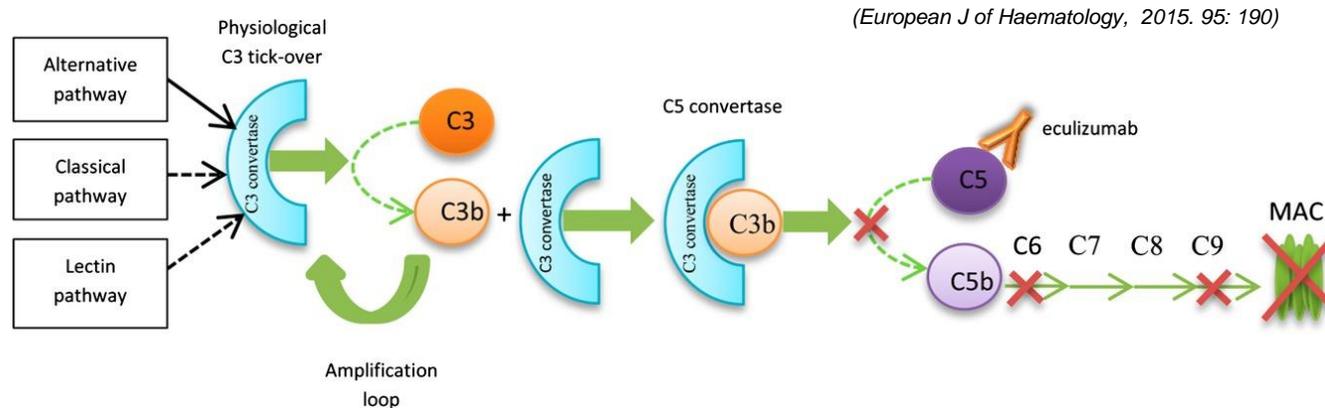
HPN ET THROMBOSE: FACTEURS DE LA COAGULATION GPI-ANCRES



TRAITEMENT

➤ L'eculizumab (Solaris®)

- Anticorps monoclonal humain humanisé (2007).
- Bloque l'activation du C5 en C5a et C5b-9
- Donné dans les formes classiques d'HPN
- Voie IV, dose d'induction de 600 mg/semaine pendant 1 mois, puis 900 mg toutes les 2 semaines



➤ Le ravaluzumab (Ultomiris®)

- Perfusion toutes les 8 semaines seulement (prix du traitement annuel: 290k€)

ECULIZUMAB : EFFICACITE

Anémie

Table III. Effect of eculizumab on transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria by pretreatment transfusion strata.

Pretreatment transfusion strata	TRIUMPH					SHEPHERD		
	Median (mean ± SE)					Median (mean ± SE)		
	6-month pretreatment‡		Week 26			1-year Pretreatment	Week 52 Eculizumab	P-value†
	Placebo	Eculizumab	Placebo	Eculizumab	P-value*			
Overall	8.5 (9.9 ± 0.7)	9.0 (9.5 ± 0.6)	10.0 (11.0 ± 0.83)	0.0 (3.0 ± 0.67)	<0.001	8.0 (12.3 ± 1.25)	0.0 (5.9 ± 1.06)	<0.001
<4 units	–	–	–	–	–	2.0 (1.6 ± 0.31)	0.0 (1.5 ± 0.69)	0.42
4–14 units	6.5 (6.2 ± 0.4)	5.5 (5.4 ± 0.3)	6.0 (6.7 ± 0.72)	0.0 (0.4 ± 0.29)	<0.001	8.0 (7.6 ± 0.44)	0.0 (4.9 ± 1.39)	0.002
15–25 units	8.8 (8.9 ± 0.5)	9.5 (9.3 ± 0.3)	10.0 (10.8 ± 1.17)	2.0 (4.2 ± 1.14)	<0.001	17.0 (19.3 ± 1.01)	4.0 (9.5 ± 3.10)	0.008
>25 units	15.0 (16.3 ± 0.9)	16.5 (15.6 ± 0.7)	18.0 (17.0 ± 1.04)	3.0 (4.5 ± 1.59)	<0.001	33.5 (36.6 ± 2.78)	7.5 (11.8 ± 4.02)	<0.001

P-values are based on a comparison of the median values.

*Wilcoxon's rank sum test.

†Signed rank test.

‡Transfusion data obtained during 12 months before treatment were normalized to a value equivalent to the value for a 6-month period.

Fonction rénale

TABLE III. Effect of 6-Month Eculizumab Treatment on Renal Function in the Placebo-Controlled TRIUMPH Study

Baseline stage	Change in stage of CKD with treatment			P ^a
	Improvement (%)	No change (%)	Worsening (%)	
Eculizumab				
All patients (n = 41)	29.3	65.9	4.9	0.005
Stages 3–5 (n = 9)	11.1	88.9	0.0	0.30
Stages 1–2 (n = 17)	64.7	23.5	11.8	0.006
Placebo				
All patients (n = 42)	16.7	69.0	14.3	0.78
Stages 3–5 (n = 9)	22.2	66.7	11.1	0.56
Stages 1–2 (n = 14)	35.7	50.0	14.3	0.25
Eculizumab vs. placebo				0.04^b

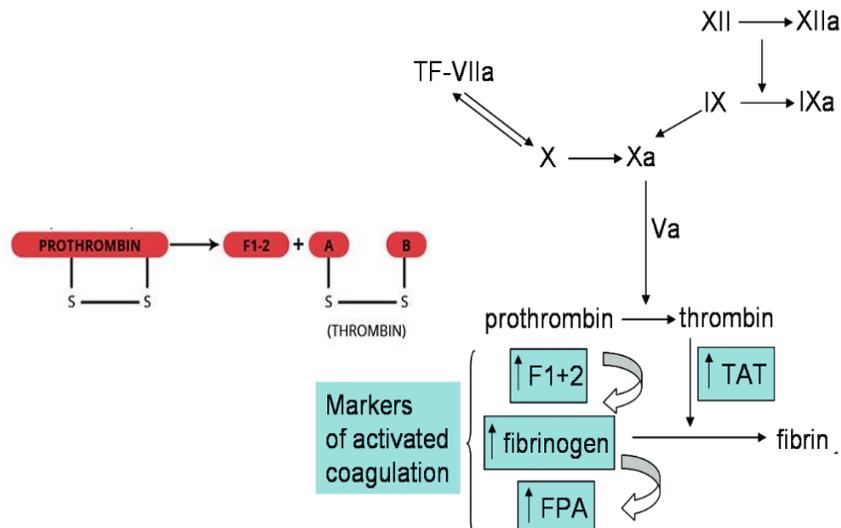
^a The comparison (except for eculizumab vs. placebo) performed for each group or for all patients, tested the null hypothesis that patients are as likely to improve as they are to worsen.

^b The comparison of eculizumab vs. placebo tests the null hypothesis that the probability of patients improving or worsening with eculizumab is equal to the same probabilities with placebo.

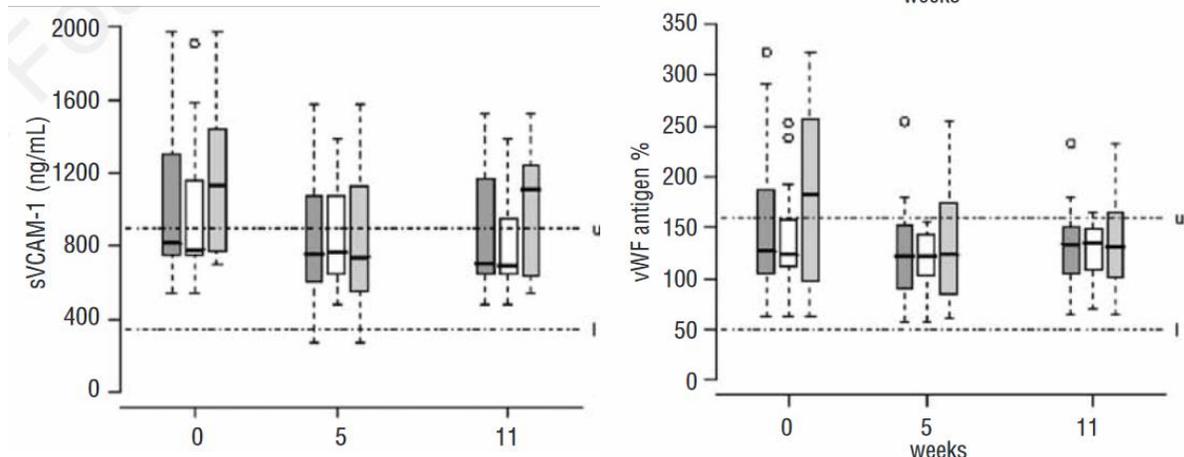
(Am. J. Hematol. 85:553–559, 2010)

- Espérance de vie identique à celle de patients de même âge (*Blood*, 2011, 117; 6786)

ECULIZUMAB ET RISQUE THROMBOTIQUE



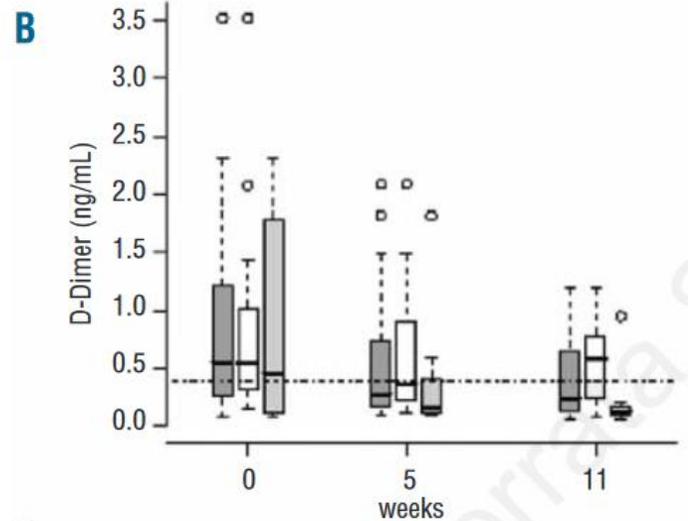
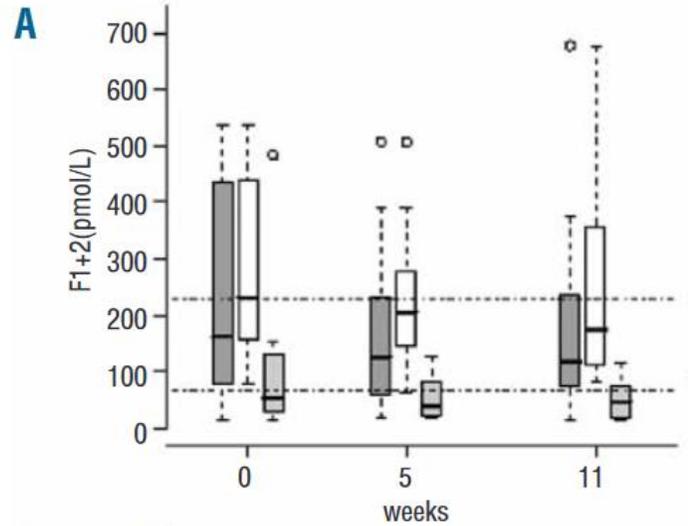
➤ Action sur l'endothélium



➤ Action sur la coagulation

- 33 patients avec HPN
- 7 sous AVK
- Traités 11 semaines par

de l'éculizumab



- Pop. entière
- Sans traitement
- Sous AVK

EFFETS INDESIRABLES

- **Augmentation du risque infectieux, notamment à *Neisseria meningitidis***

 - ⇒ Nécessité de vaccination contre le méningocoque

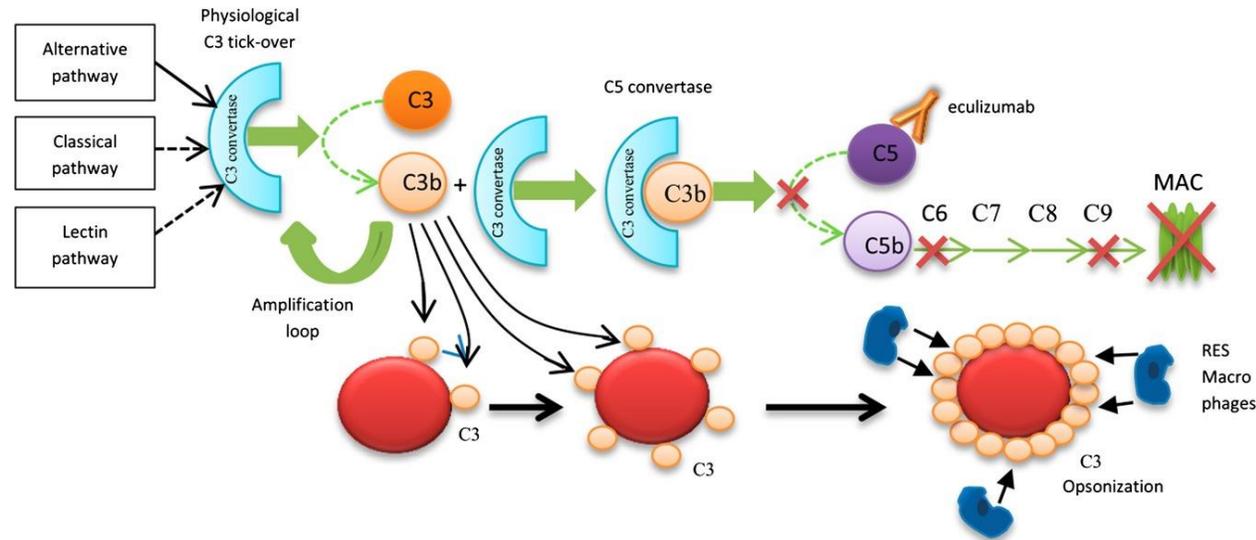
 - ⇒ Antibioprophylaxie ?

- **Céphalées (↗ de NO)**

- **Anticorps anti-médicaments**

REPONSE PARTIELLE A L'ECULIZUMAB

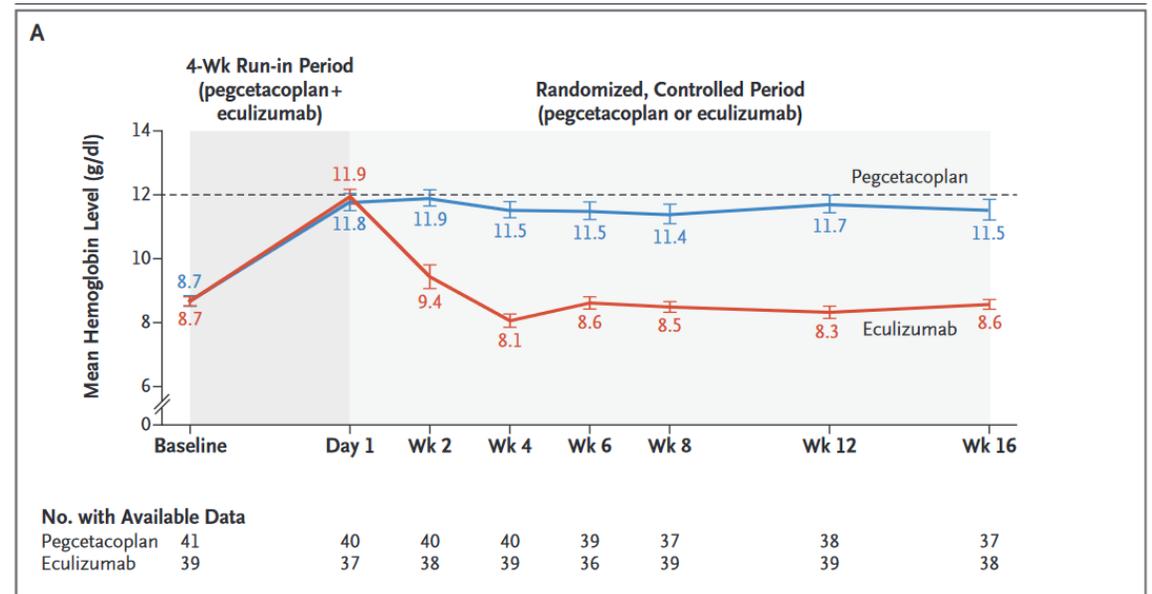
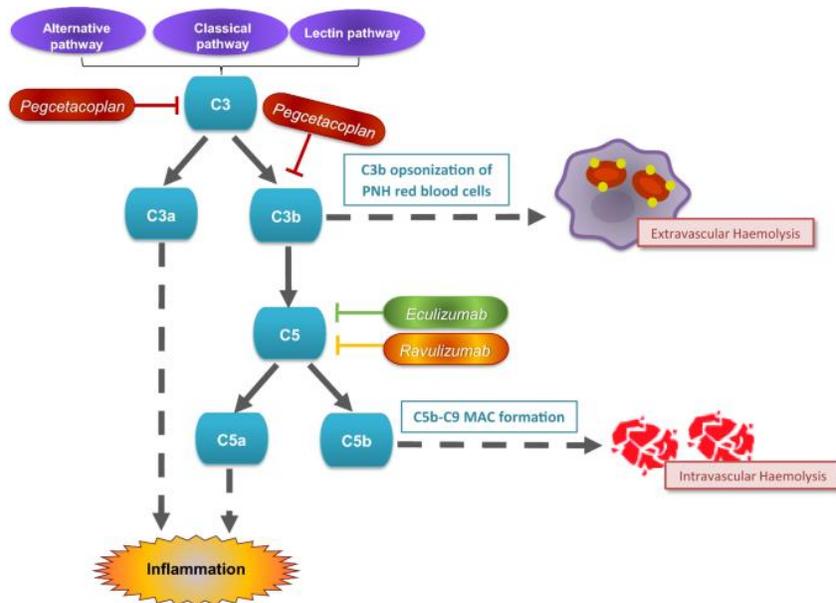
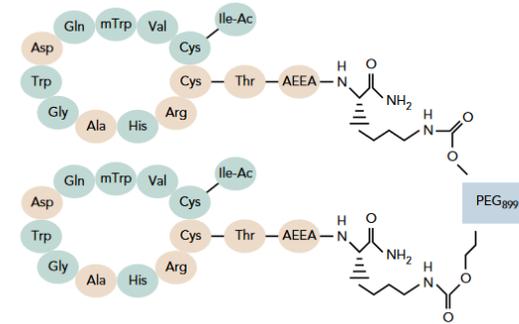
- ↗ des réticulocytes, de la bilirubine et des LDH
- ↘ hémoglobine, haptoglobine
- Opsonisation des hématies par le C3 ⇒ destruction intra-tissulaire ⇒ Test Direct à l'Antiglobuline (TDA) positif



- Traitement par corticoïdes ou splénectomie ? Pas de consensus
- **Polymorphism p.Arg885His sur le C5 ⇒ résistance à l'eculizumab**

LE PEGCETACOPLAN

- Pentadecapetide pegylé, qui cible le C3 et le C3b
- Injection SC 2 fois/semaine
- Evité l'hémolyse intra-tissulaire par opsonisation



COMPARAISON DES STRATEGIES THERAPEUTIQUES

Drug	Target	Route	Loading dose	Maintenance dose	Frequency
Eculizumab	C5	Intravenous over 1 h	600 mg weekly ×4 doses; maintenance dosing starting week 5	900 mg	Every 2 wk
Ravulizumab	C5	Intravenous over 1 h	≥40 to <60 kg: 2400 mg ≥60 to <100 kg: 2700 mg ≥100 kg: 3000 mg; start maintenance dosing 2 wk later	≥40 to <60 kg: 3000 mg ≥60 to <100 kg: 3300 mg ≥100 kg: 3600 mg	Every 8 wk
Pegcetacoplan	C3	Subcutaneous infusion over 30-60 min	Overlap with C5 inhibitor for 4 wk	1080 mg	Twice weekly; every 3 d for LDH >2× ULN

(Blood 2022, 139: 3363)

AUTRES POSSIBILITES THERAPEUTIQUES

➤ Greffe de moelle osseuse allogénique

- Seul traitement curatif
- En cas d'échec de l'eculizumab
- Pas de traitement myéloablatif, car la « *graft versus HPN* » est élevée
- Espérance de vie à 2 ans de 56 %

➤ Transfusions de Concentrés de Globules Rouges (CGR)

- Diminue l'érythropoïèse physiologique et donc l'hémolyse due au clone HPN
- Associer éventuellement un traitement chélateur de fer

➤ Erythropoïétine (EPO)

- Seulement si EPO endogène est basse

➤ Thérapie génique ????

PROPHYLAXIE DU RISQUE THROMBOTIQUE

- ↘ importante du risque thrombotique avec les anti C5
- En phase de thrombose aiguë : HBPM, puis relais AVK, mais difficultés pour équilibrer le traitement et risque hémorragique +++ si thrombopénie associée
- Aux formes hématologiques sévères, s'associent souvent des troubles digestifs, avec défaut d'absorption des médicaments, d'où l'INR instable
- AOD : 1 cas décrit (rivaroxaban) chez une femme de 42 ans avec règles hémorragiques sous AVK. Passage avec efficacité au rivaroxaban 15 mg/jr
- Utilisation des AOD reste cependant à ce jour non conseillée.

CONCLUSION

- L'HPN est une maladie orpheline
- L'expression phénotypique des hématies a permis de montrer l'absence de certains régulateurs du complément
- Le déficit n'est pas limité au CD 55 et CD59 mais à toutes les protéines GPI-ancrées, parmi celles-ci il existe des inhibiteurs de la coagulation ou des protéines de la fibrinolyse, qui pourraient en partie expliquer les phénomènes thrombotiques
- L'activation non contrôlée du complément à la surface cellulaire peut favoriser l'expression de facteurs procoagulants (Facteur Tissulaire)
- La biologie moléculaire a permis d'identifier au moins un gène responsable du défaut d'expression de GPI
- Les biotechnologies ont permis de proposer des traitements efficaces, basés sur la physiopathologie