

# ETUDE CLINIQUE

## **IMPLICATION DES MICROVÉSICULES DANS LES THROMBOSES ASSOCIÉES À L'HÉMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE**

B. DEVALET, F. MULLIER, B. CHATELAIN, JM. DOGNÉ, C. CHATELAIN

### **1. Objectifs de l'étude**

-Caractériser le phénotype complet (taille, nombre, origine, expression du facteur tissulaire et des phospholipides, activité procoagulante) des microvésicules chez les patients souffrant d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), traités ou non par eculizumab. Nous souhaitons que cette étude, réalisée avec des techniques hautement sensibles, puisse aider à prédire la survenue de thromboses chez ces patients et apporter un éclairage sur l'impact de l'eculizumab.

-Etudier l'effet des transfusions de concentrés érythrocytaires sur les microvésicules. Nous émettons l'hypothèse que ces transfusions, suite à leur contenu en microvésicules, peuvent contribuer aux thromboses dans l'HPN.

### **2. Connaissances actuelles**

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne est une maladie acquise de la cellule souche hématopoïétique. Elle est caractérisée par une mutation du gène PIG-A, responsable d'un déficit de synthèse du système d'ancrage membranaire GPI (glycophosphatidylinositol). Il en résulte un défaut de fixation de nombreuses protéines membranaires, y compris CD55 et CD59, protéines inhibitrices du complément (1). Cela se manifeste sur le plan clinique par une hémolyse intravasculaire.

Un risque thrombotique artériel et veineux important est décrit dans cette pathologie. La fréquence des événements thrombo-emboliques est de 40% chez les patients souffrant d'HPN et cela représente la cause du décès chez 40 à 67% d'entre eux. Ces thromboses sont souvent multiples, sévères et localisées à des sites inhabituels (2).

Un traitement anticoagulant en prévention primaire ou secondaire représente un risque hémorragique important chez ces patients, suite à la présence d'une thrombopénie et à la difficulté d'équilibrer le traitement par warfarine (2). De plus, la survenue de thromboses sous warfarine n'est pas rare (3). L'aspirine n'est pas un bon choix car 85% des thromboses atteignent le réseau veineux. Un traitement par héparine de bas poids moléculaire au long cours semble être un meilleur choix thérapeutique. Cependant, la définition de facteurs de risque thrombotique est indispensable afin de déterminer quel type de patient en bénéficierait. Les seuls que nous pouvons identifier à l'heure actuelle sont la présence d'un gros clone HPN et des antécédents thrombotiques (2).

La pathogenèse de l'hypercoagulabilité dans l'HPN est multifactorielle et reste mal comprise à l'heure actuelle (4-7). L'un des mécanismes potentiels de thrombose est la libération de microvésicules procoagulantes (2, 8-10)

Les microvésicules sont des vésicules phospholipidiques libérées par de nombreuses cellules dans des conditions d'activation ou d'apoptose. Leur diamètre est compris entre 30 nm et 1 µm (11). Elles semblent jouer un rôle critique dans l'hémostase, l'inflammation et la communication cellulaire (12). L'activité procoagulante de leur surface s'explique en outre par l'expression du facteur tissulaire, le principal initiateur de la coagulation (11) et l'externalisation de la phosphatidylsérine qui facilite l'assemblage des composants de la cascade de la coagulation à la surface membranaire (13).

Plusieurs études ont mis en évidence une augmentation de la libération de microvésicules procoagulantes dans l'HPN (9-10).

On retrouve également des microvésicules dans les concentrés érythrocytaires destinés aux transfusions. Leur richesse augmente avec la durée de stockage. Elles pourraient être impliquées dans les complications, notamment thrombotiques, liées aux transfusions chez certains sous-types de patients (14).

La détection et la caractérisation des microvésicules nécessitent la combinaison de plusieurs techniques (15-16). La cytométrie en flux est largement utilisée mais sa sensibilité est limitée à la détection des microvésicules de grande taille (> 500 nm) (17). Une indispensable standardisation des techniques est en cours (18-19). Des outils plus sensibles sont également en développement (15-16).

L'eculizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui bloque le clivage du composant C5 du complément. Par ce mécanisme, il empêche l'hémolyse médiée par le complément dans l'HPN. Il a été démontré qu'il diminue l'anémie, les besoins transfusionnels, la fatigue et améliore la qualité de vie (20). Il diminue également l'activation endothéliale et le risque thrombotique dans l'HPN (21, 3).

### **3. Description de l'étude**

Il s'agit d'une étude pilote, prospective, observationnelle, multicentrique et ouverte. Tous les patients doivent fournir un consentement éclairé écrit. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique du CHU Mont-Godinne.

Les patients, pouvant provenir de tous les centres belges ou luxembourgeois qui recrutent des patients HPN, seront répartis en 3 groupes : un groupe de 30 sujets sains (groupe contrôle, groupe 1), un groupe de 10 patients HPN au diagnostic ou non encore traités (groupe 2) et un groupe de 10 patients HPN qui doivent débiter un traitement par eculizumab (groupe 3).

Les critères d'inclusion pour les groupes 2 et 3 sont d'être âgé de 18 ans ou plus et d'avoir un clone HPN mesuré par cytométrie en flux d'au moins 5%. Les patients éligibles pour l'eculizumab doivent avoir reçu au moins une transfusion pendant les 12 mois précédents et avoir un taux de plaquettes au moins égal à 30 000/µL.

Le choix de traiter ou non les patients par eculizumab est cependant laissé à l'hématologue traitant en fonction de la nécessité clinique et des conditions de remboursement (médicament non fourni gratuitement). Tous les patients recevant de l'eculizumab doivent être vaccinés contre *Neisseria meningitidis*, minimum deux semaines avant l'initiation du traitement. Les patients sous traitement anti-coagulant ou corticoïdes à l'inclusion peuvent continuer ces médicaments.

Les critères d'exclusion sont une infection bactérienne active, une histoire d'infection méningococcique ou de greffe de cellules souches hématopoïétiques ainsi que la grossesse.

L'eculizumab sera administré par perfusion intraveineuse, selon un schéma comprenant tout d'abord une phase d'induction avec une dose de 600 mg tous les 7 jours pour un total de 4 doses, puis 900 mg 7 jours plus tard, suivie par une phase de maintenance de 900 mg tous les 14+/-2 jours (schéma utilisé dans les études antérieures).

Les échantillons de sang seront recueillis :

- pour le groupe 2 : à l'inclusion, à 6 mois, à 1 an et à 2 ans
- pour le groupe 3 : à l'inclusion, juste avant la première administration d'eculizumab, à la 5<sup>ème</sup> semaine juste avant la première dose de 900 mg et à la 11<sup>ème</sup> (+/- 2) semaine durant le traitement de maintenance (21)

L'analyse des microvésicules nécessitant des conditions pré-analytiques strictement identiques (technique de ponction veineuse, température, agitation, mode de centrifugation, ...) et devant être réalisée dans l'heure après le prélèvement, toutes les prises de sang seront réalisées au CHU Mont-Godinne. Le transport des patients entre leur domicile et Mont-Godinne sera assuré par nos soins. Le patient ne devra pas avoir réalisé une activité physique intense ni mangé du chocolat noir dans les 24h précédant le prélèvement. Une compensation financière sera attribuée au patient (50 euros/prise de sang).

Plusieurs caractéristiques cliniques seront consignées (âge, sexe, poids, taille, histoire d'anémie aplasique ou de myélodysplasie, caractéristiques des transfusions reçues, ...) via un formulaire à compléter envoyé par mail ou par courrier à l'hématologue traitant.

La survenue d'évènements thrombo-emboliques sera consignée lors d'une période de suivi de 2 ans pour le groupe 2 et 3.

Nous veillerons bien sûr à respecter le secret médical à chaque moment de l'étude.

#### **4. Perspectives**

Nous espérons ainsi participer à :

- l'étude de l'implication des microvésicules dans les thromboses associées à l'HPN.
- la validation des techniques de mesure des microvésicules.
- l'élaboration de recommandations pour la prévention des thromboses dans l'HPN, basées sur l'étude des microvésicules.
- l'évaluation de l'impact des transfusions de concentrés érythrocytaires sur le risque thrombotique dans l'HPN en relation avec leur contenu en microvésicules.

## 5. Bibliographie

- 1) Peffault de Latour et al. L'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Rev Med Interne*. 2010 Mar;31(3):200-7.
- 2) Weitz IC. Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Thromb Hemost*. 2011 Apr;37(3):315-21.
- 3) Hillmen et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2007;110(12):4123-8.
- 4) Grunewald et al. Plasmatic coagulation and fibrinolytic system alterations in PNH: relation to clone size. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003;14(7):685-95.
- 5) Wiedmer et al. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1993;82(4):1192-6.
- 6) Sloand et al. Increased soluble urokinase plasminogen activator receptor is associated with thrombosis and inhibition of plasmin generation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients. *Exp Hematol*. 2008;36(12):1616-24.
- 7) Jankowska et al. Loss of expression of neutrophil proteinase-3: a contributory factor in thrombotic risk in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2011 Jul;96(7):954-62.
- 8) Poskitt et al. Activation of the alternate complement pathway by autologous red cell stroma. *J Exp Med*. 1973;138(3):715-22.
- 9) Hugel et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood*. 1999;93(10):3451-6.
- 10) Simak et al. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2004;125(6):804-13.
- 11) Burnier et al. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. [Thromb Haemost](#). 2009 Mar;101(3):439-51.
- 12) Beyer et al. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. [Nat Rev Rheumatol](#). 2010 Jan;6(1):21-9.
- 13) Owens et al. Microparticles in hemostasis and thrombosis. [Circ Res](#). 2011 May 13;108(10):1284-97.
- 14) Wenche et al. Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. *Transfusion*. 2011 Apr;51:886-93.
- 15) [Van der Pol et al.](#) Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. [J Thromb Haemost](#). 2010 Dec;8(12):2596-607.
- 16) Yuana et al. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles. *J Thromb Haemost*. 2010 Feb;8(2):315-23.
- 17) Lacroix et al. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. *Semin Thromb Hemost*. 2010 Nov;36(8):807-18.
- 18) Lacroix et al. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost*. 2010 Nov;8(11):2571-4.
- 19) Mullier et al. Needs, interests, and limitations of calibrated polystyrene beads for flow cytometry-based quantification of biological microparticles. *J Thromb Haemost*. 2011 Jun 4. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04386.x.

- 20) Brodsky et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008;111(4):1840-7.
- 21) Helley et al. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica*. 2010;95:574-581.
- 22) Borowitz et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. [Cytometry. B Clin Cytom.](#) 2010 Jul;78(4):211-30.