

Université Paris Descartes

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole doctorale : Gc2id

Discipline : Physiologie-Physiopathologie

Lésions endothéliales liées à un défaut de contrôle du complément :
de la génétique du complément au syndrome hémolytique et urémique

Présentée et soutenue publiquement par

Marie Frimat

Le 30 octobre 2013

Dirigée par le Dr Véronique Frémeaux-Bacchi et le Dr Lise Halbwachs-Mecarelli

Devant un jury composé de :

Monsieur le Professeur Christian Noel	Président du jury
Monsieur le Professeur Eric Rondeau	Rapporteur
Monsieur le Professeur Philippe Rieu	Rapporteur
Madame le Professeur Sophie Susen	Examinatrice
Madame le Dr Véronique Frémeaux-Bacchi	Directrice
Madame le Dr Lise Halbwachs-Mecarelli	Directrice

Laboratoires d'accueil :

Unité INSERM U 845 "Croissance et Signalisation",

dirigée par le Pr G. Friedlander

Equipe "Mécanismes et stratégies thérapeutiques des néphropathies chroniques",

dirigée par le Dr F. Terzi

Hôpital Necker - Enfants Malades, Tour Lavoisier 6ème étage,

149 Rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15

Centre de Recherche des Cordeliers,

dirigé par le Pr W-H. Fridman

Unité INSERM U872 - Equipe 13,

dirigée le Pr C. Sautes-Fridman

15, rue de l'école de Médecine

75270 Paris Cedex 06

Résumé

L'identification fréquente de mutations des protéines régulatrices du complément suggère que les lésions endothéliales du syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa) résultent d'une activation incontrôlée de la voie alterne du complément. Les mutations, en soi, ne constituent cependant que des facteurs de susceptibilité et les mécanismes menant de l'anomalie de régulation du complément au développement de lésions de microangiopathie thrombotique rénale restent mal compris.

L'objectif de ce projet était donc d'étudier certains mécanismes de l'activation du complément à la surface des cellules endothéliales dans le SHUa et les conséquences de cette activation pour l'endothélium.

Dans ce but, ce travail s'est initialement concentré sur la mutation C3_{R139W}, dont nous avons réalisé la caractérisation phénotypique et fonctionnelle et qui a constitué un modèle d'étude des conséquences d'un complément dérégulé sur l'endothélium. Cette mutation a été identifiée de façon sporadique chez 4% des patients de la cohorte française de SHUa. Son étude phénotypique a mis en avant une évolution fonctionnelle rénale souvent sévère mais inhomogène ainsi qu'une fréquence non négligeable d'événements cardiovasculaires. Sa caractérisation fonctionnelle a révélé une augmentation de son affinité pour le facteur B, à l'origine de la formation d'une « hyper C3 convertase », échappant également en partie aux systèmes de contrôle (diminution de liaison avec la MCP). L'étude de ses conséquences endothéliales a montré, à la surface de cellules pré-activées, une augmentation des produits d'activation du complément et de l'expression membranaire de facteur tissulaire, faisant le lien avec l'acquisition d'un phénotype endothélial prothrombotique. Nous rapportons également, sous l'effet de sérum porteur de cette mutation, une majoration de la perméabilité et du détachement cellulaire, susceptibles de traduire une souffrance endothéliale.

Dans la deuxième partie et en vue de préciser les liens entre anomalie du complément et activation des cellules endothéliales, nous nous sommes intéressés au rôle de l'hémolyse,

dénominateur commun des SHU. Nous avons ainsi montré que l'hème libre activait la voie alterne du complément dans le sérum et à la surface des cellules endothéliales et ce, de façon exacerbé, en cas de dysrégulation sous-jacente du complément. Nous avons identifié plusieurs mécanismes d'action par lesquels l'hème peut activer le complément : il favorise les interactions C3/C3 et ainsi la formation d'une hyper C3/C5 convertase, déclenche une mobilisation des corps de Weibel-Palade à l'origine de l'expression membranaire de P-selectine, qui est capable d'activer la voie alterne du complément et induit une diminution de l'expression membranaire des régulateurs MCP et DAF.

Par ces travaux, nous avons précisé les liens entre activation du complément et acquisition d'un phénotype endothélial prothrombotique dans le SHUa. Nous avons notamment identifié l'hémolyse comme un acteur potentiel de l'amplification des lésions endothéliales complément-dépendantes. Son contrôle pourrait ainsi constituer une nouvelle voie thérapeutique dans le SHU.

Mots clés : syndrome hémolytique et urémique ; voie alterne du complément ; cellules endothéliales ; microangiopathie thrombotique ; hémolyse.

Remerciements

J'aimerais exprimer ici mes plus profonds remerciements à l'ensemble des personnes dont l'aide et le soutien ont permis la concrétisation de ce travail et grâce à qui ces dernières années ont été si enrichissantes.

A mes directrices de thèse, le Docteur Lise Halbwachs-Mecarelli et le Docteur Véronique Frémeaux-Bacchi,

Je vous remercie pour m'avoir chaleureusement accueillie dans le monde de la recherche. Votre confiance et votre soutien ont constitué les fondations de ce projet et vous m'avez guidé, par vos conseils, tout au long de son élaboration. Votre passion pour la recherche est contagieuse et j'espère, à mon tour, transmettre « le virus » avec autant d'enthousiasme.

A mon chef de service, le Professeur Christian Noel, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury,

Je vous remercie pour votre soutien, grâce auquel j'ai pu mener de front mon projet de recherche et mes activités médicales, ainsi que pour votre disponibilité au quotidien. Cette thèse est pour moi l'occasion de vous exprimer toute mon admiration et mon respect pour vos qualités humaines et professionnelles.

A mes rapporteurs, le Professeur Eric Rondeau et le Professeur Philippe Rieu,

Je vous remercie de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant la charge d'être rapporteurs de cette thèse et pour y avoir consacré de votre temps. Vos remarques et analyses ont contribué à enrichir les discussions issues de ce travail. Veuillez recevoir l'expression de mon plus profond respect.

Au Professeur Sophie Susen, qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail,

Je vous remercie d'avoir pris de votre temps pour examiner et critiquer ce travail. Celui-ci sera l'occasion, j'espère, de faire naître de futures collaborations. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

A tous les membres et anciens membres des équipes de recherche des unités INSERM U845 au sein de l'hôpital Necker et U872 au Centre de Recherche des Cordeliers,

Je vous remercie pour votre aide et votre présence, qui tard au laboratoire, me rappeler que non, je n'étais pas seule dans cette galère... J'ai eu la chance de faire de belles rencontres et ma reconnaissance va tout particulièrement,

Au Docteur Lubka Roumenina, qui, sans aucun doute, aura constitué l'un des piliers essentiels de ce travail. Au-delà de tes qualités pédagogiques et scientifiques, je te suis profondément reconnaissante pour ton enthousiasme, ta générosité dans la transmission de ton savoir et ta disponibilité sans faille ;

Au Professeur Philippe Lesavre, pour ses précieux conseils et l'intérêt qu'il a porté à mon travail dès mon immersion dans le monde du complément ;

A Sylvain Bigot pour m'avoir initiée à la culture cellulaire et appris le maniement de la pipette et **à Fanny Tabarin**, pour son aide précieuse dans la mise au point des différentes techniques touchant aux cellules ;

A l'ensemble de la « complement team », future équipe 10 de l'U872, merci au Dr Marie-Agnes Dragon-Durey, au Dr Moglie Le Quintrec, à Maria Chiara Marinozzi, à Tania Rybkine pour leur accueil et les réunions passionnées du mercredi matin.

Je tiens également à remercier sincèrement toute **l'équipe de néphrologie du CHRU de Lille** avec qui je prends plaisir à travailler quotidiennement,

Au Dr François Provot et au Dr Arnaud Lionet, pour m'avoir accompagnée dans mes premiers pas sur le chemin des microangiopathies thrombotiques et du complément et parce que, sans leur confiance, je n'aurais tout simplement pas eu la chance de réaliser ce travail et de faire ces rencontres ;

Au Pr Marc Hazzan, au Dr François Glowacki, au Dr Célia Lessoré de St Foy, au Dr Dominique Pagniez et au Dr Antoine Gartska pour m'avoir soutenu tout au long de mon clinicat et de ma thèse, tout particulièrement au cours de ces dernières semaines, lors de la rédaction estivale de ce manuscrit ;

A l'ensemble des membres de l'équipe, parmi lesquels Laurence, Aurélie, Jean-Michel, Véronique, à tous un grand merci pour vos encouragements.

Aux fidèles de la « mojito team », **au Dr Céline Lebas, au Dr Julie Bloch et au Dr Alexandra Botte**, merci les filles pour votre aide précieuse et votre soutien constant, vous avez tendu une oreille attentive à mes râleries diverses et participé à rendre ces années de thèse moins éprouvantes.

Au Dr Maité Daroux, pour tous ces conseils et ces encouragements depuis notre rencontre valenciennoise, j'éprouve beaucoup de satisfaction à l'idée des projets que nous serons amenées à construire côte à côte.

Je n'oublie évidemment pas mes proches qui me sont chers et dont le soutien indéfectible constitue un guide à la concrétisation de mes projets professionnels et personnels,

A mes parents, pour leur amour et parce que je sais pouvoir compter sur eux en toutes circonstances ; **A mes frères**, Olivier et Pierre-yves, à leurs compagnes, Florence et Aurélie, et leurs enfants Antonin, Alexa et Corentin, ainsi qu'aux autres membres de ma famille, ma belle famille et mes amis, avec toute mon affection, merci.

Et enfin à Mathieu,

Quoique tu en penses, ton rôle a été crucial dans l'aboutissement de ce travail, tant par ton soutien qu'en permettant de m'en échapper de temps à autre. Je ne le dirais surement jamais assez, tu rends ma vie joyeuse... avec tout mon amour, merci.

Table des matières

Résumé.....	3
Remerciements.....	5
Table des matières.....	8
Table des illustrations.....	11
Glossaire.....	13
Avant-propos.....	15
Partie 1 - Revue de la Bibliographie.....	17
Chapitre 1 : Le système du complément.....	18
1. Description générale.....	19
1.1 La cascade du complément.....	19
1.1.1 Phase initiatrice : les voies d'activation du complément.....	20
1.1.2 Les voies effectrices du complément.....	23
1.2 Les fonctions du complément.....	25
1.2.1 Rôles des anaphylatoxines.....	25
1.2.2 Rôle du complexe d'attaque membranaire.....	27
1.2.3 Rôles des opsonines.....	29
2. Etude centrée sur la voie alterne.....	31
2.1 La protéine C3.....	31
2.2 Phase initiale de la voie alterne du complément.....	33
2.2.1 Le « tick-over ».....	33
2.2.2 Surfaces amorçant l'activation de la voie alterne du complément.....	34
2.2.3 La properdine.....	37
2.2.4 Autres mécanismes d'activation de la voie alterne.....	38
2.3 Régulation de la voie alterne du complément.....	39
2.3.1 Régulateurs plasmatiques de la voie alterne.....	40
2.3.2 Régulateurs membranaires de la voie alterne.....	45
2.3.3 Régulateurs de la voie terminale commune.....	47

Chapitre 2 : Le syndrome hémolytique et urémique	49
1. Le SHU associé à des anomalies de régulation du complément	51
1.1 Historique : Emergence du rôle du complément	51
1.2 Epidémiologie et généralités cliniques.....	53
1.3 Physiopathologie du SHUa	55
1.3.1 Le terrain : facteurs génétiques de susceptibilité au SHUa.....	56
1.3.2 Environnement/Évènement : facteurs acquis de susceptibilité au SHUa.....	63
2. Autres facteurs étiologiques du SHU et place du complément.....	67
2.1 Les Shiga-toxines	67
2.1.1 Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des SHU-Stx	67
2.1.2 Mécanismes physiopathologiques des Shiga-toxines	68
2.1.3 Place du complément.....	70
2.2 Désialylation par des neuraminidases : SHU associé au pneumocoque	72
2.2.1 Acides sialiques et neuraminidases : généralités	72
2.2.2 SHU associés à des germes producteurs de neuraminidase	73
2.2.3 Place du complément.....	75
2.3 Défaut de régulation du facteur de von Willebrand: déficit en ADAMTS-13.....	75
2.3.1 Le facteur de von Willebrand : description et régulation	75
2.3.2 Le purpura thrombotique thrombocytopénique	77
2.3.3 Place du complément.....	79
2.4 Autres facteurs étiologiques identifiés	80
Chapitre 3 : Rôle de la dysfonction endothéliale et de l'hémolyse dans le SHU	82
1. Dysfonction endothéliale aigue	82
1.1 Structure de l'endothélium	83
1.1.1 Caractéristiques de la microcirculation.....	83
1.1.2 Les différents composants de l'endothélium.....	85
1.2 Principales conséquences de l'activation endothéliale aigue.....	87
1.2.1 Acquisition d'un phénotype proinflammatoire.....	87
1.2.2 Acquisition d'un phénotype prothrombotique	89
2. Rôle de l'hémolyse	95
2.1 Catabolisme de l'hémoglobine.....	95
2.1.1 L'hémoglobine	95
2.1.2 Hémolyse extravasculaire	96

2.1.3	Hémolyse intravasculaire	96
2.2	Toxicité induite par l'hémoglobine libre et ses dérivés	100
2.2.1	Principaux mécanismes de toxicité de l'Hb libre et de ses dérivés.....	100
2.2.2	Propriétés prothrombotiques	103
2.2.3	Propriétés proinflammatoires	106
2.2.4	Toxicité rénale de l'hémolyse.....	106
2.3	Maladies hémolytiques et activation du complément.....	108
2.4	Thérapeutiques ciblées sur l'hémolyse dans les MAT ?.....	109
Partie 2 - Présentation des travaux		112
Chapitre 1 : Etude centrée sur la mutation C3_{R139W} : Caractérisation fonctionnelle de la mutation et caractéristiques phénotypiques des SHUa associés.....		113
1.	Principaux résultats	113
2.	Article 1 : A prevalent C3 mutation in aHUS patients causes a direct C3 convertase gain of function.....	117
Chapitre 2 : Etude de l'activation du complément par l'hème et implication dans le syndrome hémolytique et urémique atypique		125
1.	Principaux résultats	125
2.	Article 2 : Complement activation by heme as a secondary hit for atypical hemolytic uremic syndrome.....	129
Chapitre 3 : Résultats complémentaires		130
1.	Relatifs à l'utilisation d'échantillons biologiques issus des patients	130
2.	Relatifs à l'étude des facteurs de prédisposition au SHUa.....	133
3.	Relatifs à l'étude des marqueurs de souffrance endothéliale en présence d'une anomalie de régulation du complément	136
Conclusion et Perspectives		140
Bibliographie		147
Annexes.....		173

Table des illustrations

Figures

Inclus dans la revue de la bibliographie

Figure n°1 : La cascade du complément : principaux effecteurs et régulateurs	20
Figure n°2 : Le complexe macromoléculaire C1	21
Figure n°3 : La boucle d'amplification	24
Figure n°4 : Les différents effecteurs du complément	30
Figure n°5 : Structure de la protéine C3	32
Figure n°6 : Représentation schématique des différentes étapes de clivage du C3	33
Figure n°7 : Surfaces initiatrices de la voie alterne du complément	36
Figure n°8 : Fonctions de la properdine au sein de la voie alterne du complément	38
Figure n°9 : Régulation de la voie alterne du complément	39
Figure n°10 : Les principaux sites de liaison du FH avec le C3b et les GAG	41
Figure n°11 : Le facteur H et ses protéines apparentées	43
Figure n°12 : Emergence du rôle du complément dans le SHU	51
Figure n°12 : Le SHUa : une pathologie multifactorielle complexe	56
Figure n°13 : Cytotoxicité endothéliale directe des Shiga-toxines	70
Figure n°14 : Représentation schématique des conséquences in vivo d'un déficit en ADAMTS-13	77
Figure n°15 : Structure des différents segments de l'endothélium microvasculaire	84
Figure n°16 : Les différents acteurs de l'endothélium microvasculaire	85
Figure n°17 : Principales conséquences de l'activation endothéliale aigue	88
Figure n°18 : Le système de la coagulation et les différentes fonctions de la thrombine	91
Figure n°19 : Le système de la fibrinolyse et sa régulation	92
Figure n°20 : Structure de l'hémoglobine et de ses dérivés	96
Figure n°21 : Principales conséquences de l'hémolyse intravasculaire	105

Inclues dans les résultats complémentaires

Figure n°22 : L'activation du complément à la surface de cellules endothéliales est comparable, que la source de complément soit du sérum ou du plasma.	131
Figure n°23 : L'activation du complément à la surface de cellules endothéliales prétraitées par de l'hème est amplifiée en présence de plasma issu de patients souffrant de SHUa ..	132
Figure n°24 : L'expression membranaire de MCP à la surface de cellules endothéliales natives n'est pas influencée par l'haplotype MCP ggaac	134
Figure n°25 : L'activation du complément à la surface de cellules endothéliales n'est pas influencée par l'haplotype MCP ggaac.....	134
Figure n°26 : Etude du détachement cellulaire : méthodologie schématique.....	136
Figure n°27: Etude de la perméabilité cellulaire : méthodologie schématique	137
Figure n°28 : Augmentation du détachement spontané des cellules en présence de sérum au complément dérégulé.....	138
Figure n°29 : Augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire en présence de sérum au complément dérégulé.....	138

Tableaux :

Tableau n°1 : Fréquence des anomalies du complément identifiées chez les patients ayant présenté un SHUa	55
Tableau n°2 : Médiateurs endothéliaux impliqués dans la régulation de l'hémostase	90

Glossaire

A

Ac : Anticorps

ADAMTS-13 : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeats

ADN : Acide desoxyribonucléique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

Antigène T : Antigène Thomsen-Friedenreich

AP : Antiplasme

C

C3aR : C3a Receptor

C3Nef : Facteur néphritique

C4BP : Complement component 4 Binding Protein

C5aR : C5a Receptor

C5b-9s : C5b-9 soluble

C5L2 : C5a-like Receptor

C8bp : C8 binding protein

CAM : Complexe d'Attaque Membranaire

CCP : Complement-control protein module

CE : Cellule endothéliale

Cellules NK : Cellules Natural killer

CFHL-1 : Complement Factor H Like protein-1

CFHR : Complement Factor H Related Proteins

CNP : Peptide natriurétique de type C

CR : Complement Receptor

CRlg : Complement Receptor of the Immunoglobulin superfamily

CRP : C-reactive protein

CUB : Complement C1r/C1s, Uefg (urchin embryonic growth factor) and bone morphogenetic protein 1

D

DAF : Decay Accelerating Factor for complement

DDD : Maladie à dépôts denses

DGKE : Diacylglycerol kinase ϵ

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DO : Densité optique

E

EDHF : Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

EDTA : Ethylene Diamine Tetra acetic Acid

EGM2 : endothelial growth medium 2

EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EPCR : Récepteur de la protéine C

F

FACS : Fluorescence acquired cell sorter

FB : Facteur B

FcR : Fc-gamma receptor

FD : Facteur D

FH : Facteur H

FI : Facteur I

FT : Facteur tissulaire

FvW : Facteur de von Willebrand

G

GAG : Glycosaminoglycanes

Gb3 : Globotriaosylcéramide

GEnC : Glomerular Endothelial Cells

GMPC : Guanosine monophosphate cyclique

GNMP : Glomérulonéphrite membrano-proliférative

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

H

Hb : Hémoglobine
HEGP : Hôpital Européen Georges Pompidou
HELLP : Hemolysis, Elevated Liver enzymes,
Low Platelet count
Hp : Haptoglobine
HRF : Homologous Restriction Factor
HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial
Cells
HO: Heme-oxygenase
Hx : Hemopexine

I

ICAM-1 : Inter Cellular Adhesion Molecule-1
IFN : Interferon
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine

L

LDL : Low density lipoprotein
LPS : Lipopolysaccharide

M

MASP : Mannan-associated serine protease
MAT : Microangiopathie thrombotique
MBL : Mannan-binding lectin
MCP : Membrane cofactor protein
MEC : Matrice extra-cellulaire
MFI : Mean fluorescence intensity
MG : Macroglobulines
MIRL : Membrane inhibitor of reactive lysis

N

NHS : Normal human serum
NOS : NO synthase

P

PAI-1 : Inhibiteur de type 1 de l'activateur du
plasminogène
PAR : Protease activated receptor
PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion
molecule-1
PFA : Paraformaldéhyde
PG : Prostaglandine

PI3K : Phosphatidyl inositol 3 Kinase

PKC : Protéine kinase C

PMN : Polynucléaire neutrophile

PTT : Purpura thrombotique
thrombocytopénique

R

RCA : Regulator of Complement Activation

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RFI : Relative Fluorescence Intensity

ROS : ROS (Espèces réactives de l'oxygène)

S

SCR : Short Consensus Repeat

SHU : Syndrome hémolytique et urémique

SHUa : SHU atypique

SHU-Sp : SHU associés à Streptococcus
Pneumoniae

SHU-Stx : SHU secondaires aux Shiga toxines

SNP : Single nucleotide polymorphism

SPR : Surface plasmon resonance

STEC : Shiga-toxin-Producing E. coli

Stx : Shiga-toxines

T

TAFI : Thrombin-activatable fibrinolysis
inhibitor

TED : Thioester-containing-Domain

TFPI : Tissue Factor pathway Inhibitor

THBD : Thrombomoduline

THPM (FvW) : Très hauts poids moléculaires

TLR : Toll like receptor

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène

TSR : Thrombospondin type I repeat

TxA2 : Thromboxane A2

U

u-PA : Urokinase

V

VCAM-1 : Vascular cell Adhesion Molecule-1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Avant-propos

Le syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa) est une microangiopathie thrombotique au tropisme préférentiellement rénal. Il s'agit d'une pathologie rare, dont le pronostic fonctionnel reste sombre. Selon l'hypothèse actuellement admise, les lésions endothéliales du SHUa résulteraient d'une activation excessive de la voie alterne du complément à leur surface. Ceci est notamment conforté par l'identification, chez plus de 60% des patients, d'anomalies - génétiques ou acquises - susceptibles d'induire une rupture de l'équilibre entre régulation et activation du complément. Ces anomalies ne constituent, cependant, que des facteurs de susceptibilité et certains aspects de la physiopathologie du SHUa restent mal compris.

Mon travail de recherche s'est ainsi concentré sur cette pathologie et sur l'étude de ses mécanismes physiopathologiques. Il a été réalisée en collaboration et au sein de différentes équipes : unité INSERM U845 de l'Hôpital Necker (Dr Lise Halbwachs-Mecarelli, Pr Philippe Lesavre - Biologie cellulaire) ; unité INSERM U872 du Centre des Cordeliers (Dr Lubka Roumenina - Biologie moléculaire) ; laboratoire d'immunologie de l'HEGP (Dr Véronique Frémeaux-Bacchi - Génétique) ; équipe de Néphrologie du CHRU de Lille (Pr Christian Noel, Dr François Provot, Dr Arnaud Lionet).

Au-delà de l'intérêt propre lié à l'amélioration des connaissances relatives au SHUa, étudier cette pathologie, qui constitue un modèle d'étude de lésions endothéliales liées à un défaut de contrôle du complément, peut aider à préciser les liens entre activation du complément et souffrance endothéliale. L'intérêt de son étude peut ainsi s'étendre à d'autres pathologies, notamment vasculaires, pour lesquelles le rôle d'une activation excessive du complément est suspecté, telle que l'athérosclérose¹.

Ce projet de recherche avait donc pour principal objectif d'affiner nos connaissances des points faibles de l'endothélium, susceptible d'être perturbé par une activation incontrôlée du complément à sa surface et pouvant rendre compte des caractéristiques de

microangiopathie et de thrombose observées dans le SHUa. Dans ce but, la mutation C3_{R139W}, dont la prévalence au sein de la cohorte française de SHUa est élevée, a servi de modèle d'étude des conséquences d'un complément mal régulé sur l'endothélium. Nous avons également travaillé à l'identification d'autres mécanismes susceptibles de participer à la formation des lésions endothéliales dans le SHUa. Ces travaux nous ont amenés à nous intéresser tout particulièrement au rôle de l'hémolyse, qui s'est avérée être un puissant activateur de la voie alterne du complément et dont le contrôle pourrait ainsi constituer une nouvelle voie thérapeutique.

Ce travail sera présenté selon l'organisation suivante :

- La première partie sera consacrée, dans le cadre d'une revue de la bibliographie, à la présentation des différents protagonistes de ce travail :
 - le chapitre 1 présentera le système du complément, tout particulièrement sa voie alterne, avec pour objectif, notamment, la mise en avant de ses propriétés endothéliales prothrombotiques et proinflammatoires.
 - Le chapitre 2 s'intéressera en premier lieu au syndrome hémolytique et urémique associé à des anomalies de régulation du complément. La place du complément dans les SHU rattachés à d'autres facteurs étiologiques sera également discutée.
 - Le chapitre 3 portera sur les principales conséquences de l'activation endothéliale aigue ainsi que sur les propriétés vasculaires de l'hémolyse.
- Dans la seconde partie de ce travail seront rapportés les principaux résultats expérimentaux issus de ce projet de recherche. Chacun des deux articles publiés, sera précédé d'une brève présentation résumant les résultats et points de discussion essentiels.
- Enfin, les conclusions de ce travail seront l'occasion de présenter les principales perspectives de ce projet, visant à poursuivre l'amélioration des connaissances de la physiopathologie des lésions endothéliales complément-dépendantes.

Revue de la Bibliographie

Chapitre 1 : Le système du complément

La découverte, en 1888, des propriétés bactéricides de certains composants plasmatiques a révélé une nouvelle ligne de défense immunitaire², initialement décrite par Paul Ehrlich comme un « complément » de l'immunité humorale³ et supposée n'être alors qu'un mécanisme d'appoint de protection contre les agents microbiens. Cette vision a très largement évolué et le système du complément est aujourd'hui décrit comme une « pierre angulaire » de l'immunité⁴.

Il s'agit d'un des plus anciens systèmes de régulation de l'immunité et de l'homéostasie (600-700 millions d'années), dont les rôles se sont diversifiés au cours de l'évolution⁵. S'il appartient à l'immunité innée, son activation reposant sur des liaisons physico-chimiques et non sur la reconnaissance spécifique d'une cible, ses fonctions dépassent de loin ce cadre. En plus de constituer la première ligne de défense contre les agents pathogènes, il orchestre la réponse immunitaire via ses interactions avec de nombreuses cellules inflammatoires, module la réponse immune adaptative, participe à la clairance des cellules apoptotiques et complexes immuns circulants^{6,7}. Il est également impliqué dans différents processus, tels que le métabolisme lipidique, l'angiogenèse ou la régénération tissulaire⁴.

L'activation adaptée de ce système puissant, mais non spécifique, permet donc d'aboutir à l'élimination des agents pathogènes et/ou cellules endommagées et participe à la synchronisation du processus inflammatoire, en respectant les cellules de l'hôte. Cependant, ces trente dernières années ont été marquées par la mise en évidence d'une activation inadaptée du complément dans un grand nombre de pathologies variées - dégénératives, auto-immunes, néoplasiques, infectieuses - au point d'en faire aujourd'hui une cible thérapeutique privilégiée^{8,9}.

Parmi ces pathologies, le syndrome hémolytique et urémique atypique, sur lequel s'est principalement concentré mon travail de thèse, constitue un modèle de pathologie secondaire à une activation excessive de la voie alterne du complément.

L'objectif de ce chapitre est donc de présenter le système du complément, ses fonctions, qui en cas de dysrégulation sont susceptibles d'être délétères pour l'organisme, en insistant plus particulièrement sur les caractéristiques de la voie alterne.

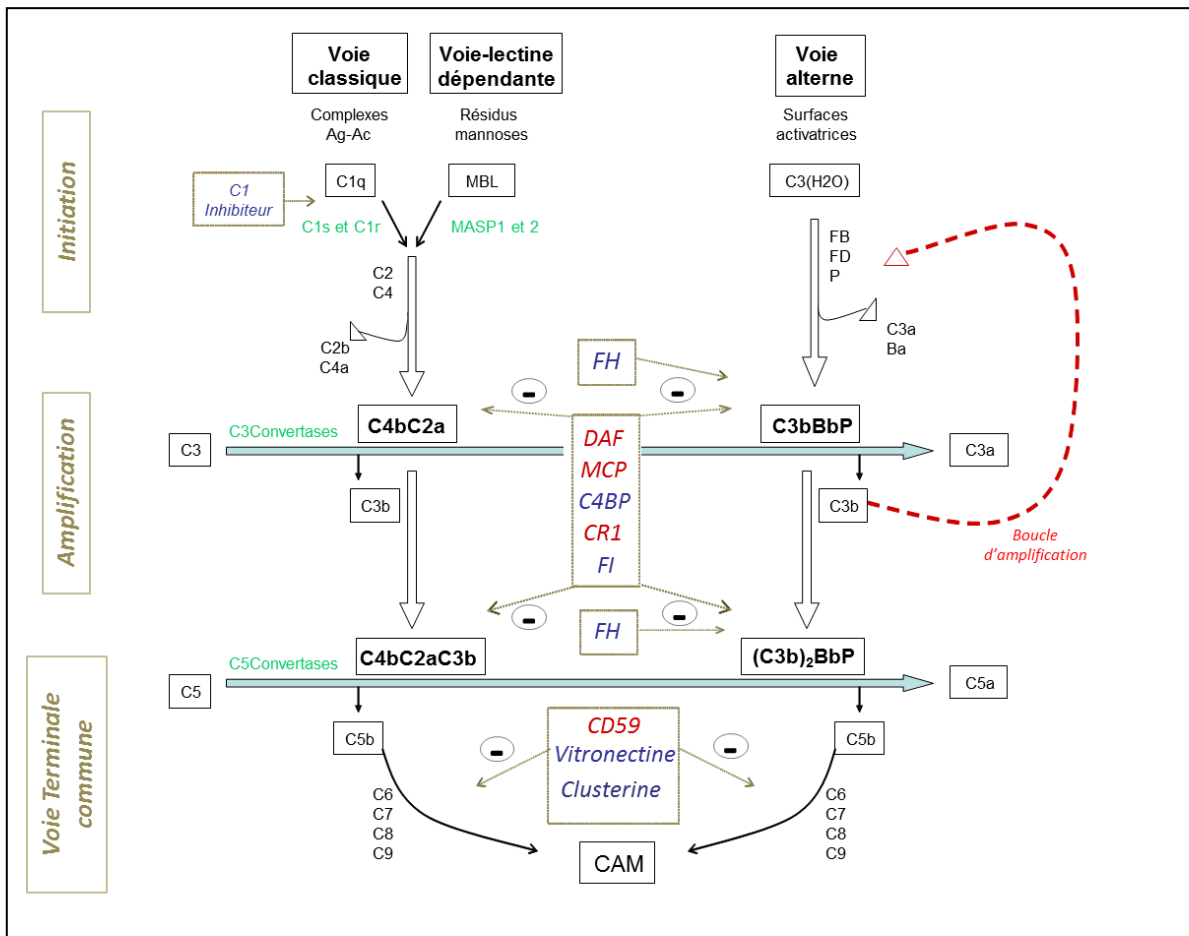
1. Description générale

Le système du complément intervient de manière rapide et localisé et se caractérise par un fonctionnement en cascade soumis à plusieurs niveaux de régulation. Il se compose d'environ 50 protéines, activatrices ou régulatrices, qui sont soit circulantes à synthèse majoritairement hépatique, représentant environ 15% des globulines sériques totales, soit membranaires exprimées à la surface de nombreux types cellulaires. Ces protéines, répertoriées dans l'annexe n°1 (p. 185), ont des fonctions diverses (protéase, récepteur membranaire, protéine de liaison) par lesquelles elles interagissent entre elles pour déclencher, à travers cette cascade hautement régulée, les différentes activités biologiques qui finalisent l'activation du complément.

1.1 La cascade du complément

La cascade du complément est traditionnellement décrite comme composée d'une phase initiatrice, qui aboutit par divers intermédiaires à l'activation du complément, d'une phase d'amplification et d'une phase effectrice (voie terminale commune), à l'origine des différentes fonctions du complément (figure n°1, p.18).

Figure n°1 : La cascade du complément : principaux effecteurs et régulateurs



Ag : antigène, **Ac** : anticorps, **CAM** : complexe d'attaque membranaire, **FB** : Facteur B, **FD** : Facteur D, **MASP** : Mannan-associated serine protease, **MBL** : mannan-binding lectin, **P** : properdine.

Régulateurs membranaires : **CR1** : complément receptor 1, **DAF** : decay accelerating factor, **MCP** : membrane cofactor protein.

Régulateurs plasmatiques : **FH** : facteur H ; **FI** : facteur I ; **C4BP** : C4 Binding Protein.

1.1.1 Phase initiatrice : les voies d'activation du complément

L'activation du complément peut être initiée par trois voies distinctes, la voie classique, la voie alterne et celle des lectines, qui présentent chacune leurs spécificités.

La voie classique

La voie classique débute par la liaison de la protéine C1q à l'un de ses ligands. Ces derniers sont majoritairement représentés par les immunoglobulines IgG (en particulier IgG1 et IgG3) et IgM, ce pourquoi cette voie est dite classiquement « anticorps dépendante »¹⁰. Cependant, le C1q peut reconnaître d'autres molécules, particules microbiennes ou

protéines inflammatoires, tel que la CRP (C-reactive protein), qui lui permettent de discriminer les surfaces pathogènes ou apoptotiques des cellules de l'hôte¹¹.

Le C1q constitue la protéine de reconnaissance du complexe macromoléculaire C1. Ce complexe (C1q₂S₂) calcium-dépendant, se compose en plus du C1q, de deux protéases à sérine, C1s et C1r, organisées en hétéro-tétramère (figure n°2). La fixation du C1q à son ligand induit une auto-activation du C1r, qui peut alors cliver et activer ainsi le C1s^{11,12}.

Figure n°2 : Le complexe macromoléculaire C1 (adaptée de Wallis, Immunobiology, 2010)¹¹

Le complexe (C1q₂S₂) se compose d'une protéine C1q, qui est un hexamère dont chaque sous-unité est constitué de trois chaînes peptidiques organisées en triple hélice, et qui porte en son sein deux protéases à sérine, C1s et C1r, organisées en hétéro-tétramère. L'activation successive de C1r puis C1s induit une modification conformationnelle du complexe C1, qui rend possible l'interaction C1s-C4 et C1s-C4bC2.

Le C1s activé intervient ensuite via deux clivages protéolytiques successifs^{13,14} :

- celui du composant plasmatique C4, formant ainsi du C4a, anaphylatoxine libérée en phase fluide et du C4b qui se fixe de façon covalente à la surface-cible de l'activation par son domaine thioester libéré par le clivage enzymatique ;
- celui du composant plasmatique C2, préalablement lié au C4b, en un fragment C2a qui reste associé au C4b et un fragment C2b, libéré en phase fluide.

Cette cascade de protéolyses successives aboutit donc à la formation, sur la surface activatrice, d'un complexe C4b2a, qui correspond à une C3 convertase classique, dont l'activité enzymatique est portée par la sous-unité C2a. (Notons que, par souci d'analogie avec la C3 convertase alterne, certains auteurs proposent de modifier la nomenclature du

composant C2, de sorte que le fragment protéolytique soit nommé C2b et non C2a, et que la C3 convertase classique soit ainsi désignée par C4b2b)⁴.

Le complexe C1 est spécifiquement régulé par une protéine, le C1-Inhibiteur qui, après activation par le C1s activé, peut induire la dissociation du complexe C1, de sorte que seul le C1q reste lié à sa cible.

La voie des lectines

La voie des lectines présente des similitudes avec la voie classique¹⁵. La protéine de reconnaissance est ici une protéine MBL (mannan-binding lectin) ou une ficoline, qui vont initier cette voie par leur liaison à certains carbohydrates des micro-organismes¹⁶. MBL et ficolines ont une structure proche de celle du C1q et peuvent s'associer à des protéases à sérine, dénommées MASP-1, -2 et -3 (mannan-associated serine protease) qui, elles-mêmes, présentent de fortes homologues avec les protéines C1s et C1r¹¹.

Les complexes MBL/MASP-2 ou ficoline/MASP-2, dont les interactions sont également calcium-dépendantes, sont capables d'activer le complément. En effet, MASP-2 possède une activité catalytique similaire à celle de C1s, lui permettant de cliver les protéines C4 et C2 et donc de former une C3 convertase identique à celle issue d'une activation par la voie classique¹⁷.

La voie alterne

Les spécificités de l'activation et des acteurs de la voie alterne seront abordées plus en détails dans une section suivante, dédiée à la voie alterne (section 2.1, p.29).

Brièvement, à la différence des voies classique et lectine, la voie alterne n'est pas déclenchée par une liaison spécifique ligand-protéine de reconnaissance. Elle a la particularité d'avoir un fond d'activation permanent via une hydrolyse spontanée du C3, formant du C3(H₂O)¹⁸. En l'absence de régulation, il en résulte la formation, en phase fluide, d'une C3 convertase alterne initiatrice¹⁹, constitutivement activée, qui peut générer du C3b. Celui-ci sera rapidement inactivé par les protéines régulatrices présentes dans l'environnement des cellules hôtes. A l'inverse, il pourra se lier à toute surface non régulée

(agents pathogènes étrangers ou issus de l'hôte, tels que les cellules tumorales ou apoptotiques) et former une C3 convertase alterne, capable d'activer et amplifier la cascade du complément²⁰.

La formation de la C3 convertase alterne débute par la liaison covalente, magnésium-dépendante, du C3(H₂O) ou du C3b avec le facteur B (FB). Cette liaison induit des changements de conformation du FB, permettant son clivage protéolytique par une protéase à sérine, le facteur D (FD), qui circule sous forme active dans le plasma. Ce clivage libère en phase fluide un fragment Ba, tandis que le fragment Bb, qui porte l'activité enzymatique, reste associé au C3b, formant ainsi une C3 convertase alterne (C3bBb). Ce complexe enzymatique très labile est ensuite stabilisé par la properdine, protéine de régulation décrite en détail plus loin.

La voie des protéases extrinsèques

Cette terminologie est apparue assez récemment pour désigner certaines protéases, chez lesquelles a été identifiée une capacité à cliver les composants C3 et/ou C5 et donc à activer les fonctions effectrices du complément, indépendamment des voies proximales d'activation traditionnelles. Il s'agit principalement de protéases impliquées dans la régulation de l'hémostase, rendant compte du lien étroit existant entre ces deux systèmes^{21, 22}. Amara et al ont ainsi montré la génération de C3a et C5a sous l'effet de thrombine, FIXa, FXIa, plasmine et FXa, avec un effet plus marqué pour ces deux derniers²³.

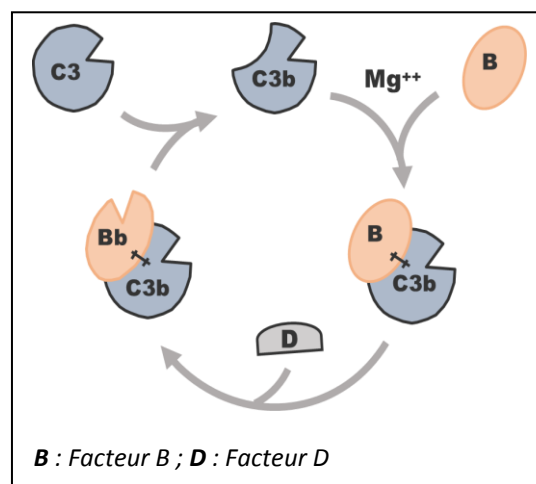
1.1.2 Les voies effectrices du complément

Le C3 constitue le point de convergence des trois voies d'activation du complément. Il est clivé de façon identique par les C3 convertases alterne (C3bBb) et classique (C4b2a) en C3a, anaphylatoxine libérée en phase fluide, et en C3b. Ce dernier peut se fixer de façon covalente à une surface activatrice, où son devenir est alors multiple, déterminant les différentes voies effectrices du système du complément.

La voie d'amplification

Le C3b lié à sa cible peut s'associer à une autre molécule de FB pour former, après action du FD et de la properdine, une nouvelle C3 convertase alterne. Celle-ci sera capable à son tour de cliver de nouvelles molécules de C3. Cette boucle d'amplification induit une production exponentielle de C3b²⁰, et donc de complexes d'attaque membranaire, d'anaphylatoxines et d'opsonines. La voie alterne est ainsi capable d'auto-amplification. Elle peut également par cette boucle, amplifier l'activation du complément initiée par la voie classique ou dépendante des lectines.

Figure n°3 : La boucle d'amplification



La voie terminale commune

La voie terminale commune est déclenchée par la liaison d'une molécule supplémentaire de C3b à une C3 convertase alterne (C3bBb)C3b ou classique (C4b2a)C3b. Ceci leur confère une activité enzymatique C5 convertase²⁵. Ces C5 convertases classiques ou alternes lient puis clivent, de façon là aussi identique, le C5 via leur sous-unité C2a ou Bb, respectivement. Cette protéolyse du C5 induit la libération en phase fluide d'une autre anaphylatoxine, le C5a et du fragment C5b. Ce dernier sert de plateforme pour la liaison de la protéine C6, qui stabilise ce complexe soluble, puis de la protéine C7. La liaison de C7 induit une modification structurale du complexe C5b-7, caractérisée par l'exposition de résidus hydrophobes. Le complexe C5b-7, devenu lipophile, s'ancre alors à la double couche lipidique de la surface cible, où il recrute la protéine C8. A son tour, le C8 subit une modification conformationnelle, responsable d'une exposition de résidus hydrophobes, de

sorte que le complexe C5b-8 forme déjà un canal transmembranaire de petit diamètre (10 Å), inapte à la lyse cellulaire. La liaison du complexe C5b-8 à la protéine C9 induit ensuite une polymérisation spontanée de 10 à 18 protéines C9, donnant ainsi naissance au complexe d'attaque membranaire (CAM ou C5b-9), qui forme un pore cylindrique transmembranaire d'un diamètre d'environ 70 à 100 Å, à l'origine des activités lytiques du complément^{26,27}.

1.2 Les fonctions du complément

L'activation de la cascade du complément donne ainsi naissance à de nombreux acteurs (anaphylatoxines, CAM, opsonines), qui participent à la défense de l'hôte vis-à-vis des agents pathogènes. Leurs fonctions sont multiples (résumées dans la figure n°4, p.28), et ce d'autant plus qu'ils interagissent avec d'autres protéines impliquées dans la régulation, notamment, de l'inflammation, de la coagulation ou de l'immunité adaptative.

1.2.1 *Rôles des anaphylatoxines*

Les anaphylatoxines C3a, C4a et C5a, fragments actifs issus du clivage respectif de la chaîne α des protéines C3, C4 et C5, sont des polypeptides cationiques d'environ 10kDa, qui constituent d'importants médiateurs de l'inflammation. C5a est, parmi elles, l'anaphylatoxine la plus efficace, tandis que les fonctions du C4a sont moins bien définies (C5a < C3a < C4a)²⁸. Toutes trois présentent un résidu arginine carboxy-terminal qui peut être clivé par des carboxypeptidases, ce qui diminue fortement leurs propriétés inflammatoires^{29,30}.

Les récepteurs des C3a et C5a sont respectivement les C3aR (54kDa) et C5aR (48kDa), auxquels s'ajoutent un troisième récepteur plus récemment identifié, le C5L2 ou C5aR₂³¹. Celui-ci présente environ 60% d'homologie avec les C3aR et C5aR et est capable de lier les deux peptides³². Les travaux actuels tendent à le définir comme un antagoniste fonctionnel

du C5aR mais ses fonctions restent encore imprécises³³. C3aR et C5aR appartiennent, tous deux, à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G^{34,35}. Ils sont fortement exprimés, en particulier le C5aR, à la surface des cellules d'origine myéloïdes (granulocytes, monocytes/macrophages, cellules dendritiques) ainsi qu'à celle des cellules endothéliales (HUVECs ; cellules endothéliales microvasculaires murines)^{36,37}. Leur expression endothéliale est, par ailleurs, majorée sous l'effet de stimuli proinflammatoires. La synthèse de C5aR est ainsi augmentée par l'IFN γ , le LPS et l'IL-6 au sein de cellules endothéliales microvasculaires³⁷.

L'activation des C3aR et C5aR induit différentes voies de signalisation intracellulaire et ainsi divers effets biologiques, variables en nature et/ou en intensité en fonction du récepteur activé et de la cellule-cible. Brièvement, les principales conséquences biologiques de la liaison des anaphylatoxines à leurs récepteurs sont les suivantes :

- Augmentation de la perméabilité vasculaire, par stimulation des mastocytes et des polynucléaires basophiles, qui libèrent alors de l'histamine, ainsi que par induction d'une rétraction des cellules endothéliales^{38,39};
- Stimulation de la synthèse de cytokines inflammatoires, en particulier de TNF α , d'IL-1 et d'IL-6^{40,41};
- Chimioattraction des cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, monocytes/macrophages ainsi que lymphocytes T et B activés)⁴² de façon direct ou via l'augmentation de synthèse d'IL-8 et de RANTES par les cellules endothéliales³⁶;
- Activation des cellules endothéliales, avec notamment augmentation de l'expression membranaire des molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine)⁴³ et libération de Facteur de von Willebrand (FvW) et de P-selectine à leur surface⁴⁴ ;
- Dégranulation des granulocytes (neutrophiles, éosinophiles, basophiles) et des mastocytes induisant la libération de nombreux facteurs proinflammatoires et/ou prothrombotiques⁴²;
- Migration trans-endothéliale des neutrophiles et éosinophiles^{45,46} ;
- Effets prothrombotiques à travers, notamment, une activation plaquettaire, l'augmentation d'expression endothéliale de facteur tissulaire (FT)⁴⁷ et la stimulation de

synthèse par les mastocytes, d'inhibiteur de type I de l'activateur du plasminogène aux effets anti-fibrinolytiques⁴⁸ ;

- Modulation complexe de la réponse immune adaptative, principalement lymphocytaire T, avec pour le C5a une induction des réponses Th1 et Th17 (sauf pour certains modèles expérimentaux) et une inhibition Th2, et pour le C3a une induction des réponses Th1 et Th2 (là aussi, à l'exception de certains modèles expérimentaux) et une inhibition Th17⁴⁹. Ce dernier point illustre bien la complexité du fonctionnement de ces peptides, qui peuvent s'avérer être des régulateurs négatifs de la réponse immunitaire et ce probablement dans le but de limiter une réponse systémique trop excessive et donc délétère, comme il peut exister, par exemple, dans le choc septique.

Les anaphylatoxines interviennent donc dans les différentes étapes de l'inflammation et dans l'acquisition d'un phénotype vasculaire prothrombotique. Elles sont également impliquées dans les processus de régénération et de fibrose tissulaire^{50,51}.

1.2.2 Rôle du complexe d'attaque membranaire

Lyse cellulaire par le complexe d'attaque membranaire

Le complexe d'attaque membranaire (CAM) forme des pores transmembranaires d'un diamètre d'environ 100 Å à la surface des cellules cibles⁵². Ces pores, en laissant passer les molécules d'eau et petits ions à travers la membrane plasmique, sont responsables d'un déséquilibre osmotique létal. L'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire induite par les CAM peut également, à concentrations lytiques, entraîner une dysfonction mitochondriale susceptible de conduire à la mort cellulaire⁵³.

La lyse est d'autant plus efficace que les pores sont nombreux. Leur concentration à la surface des cellules cibles peut d'ailleurs être diminuée par des mécanismes d'endocytose ou de clivage membranaire^{54,55}. D'autre part, les cellules nucléées sont plus résistantes à l'action des CAM.

Fonctions sublytiques du complexe d'attaque membranaire

Lorsque la concentration membranaire de CAM est insuffisante pour induire la mort cellulaire, elle est dite sublytique. Les conséquences de la liaison de C5b-9 sublytique et des complexes sublytiques C5b-7 et C5b-8 sont multiples. Elles comprennent notamment une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et d'AMP (adénosine monophosphate), responsable de l'activation de divers voies ou médiateurs de signalisation intracellulaire (NF κ B, protéine kinase C, inflammasome NLRP3, phospholipase A2, phosphatidylinositol-3-kinase)⁵⁶⁻⁵⁹. Ainsi, le CAM sublytique induit la production d'une grande variété de cytokines et médiateurs proinflammatoires ainsi que l'expression à la surface des cellules endothéliales d'ICAM-1, VCAM-1 et E-selectine⁶⁰ et la migration trans-endothéliale des neutrophiles⁶¹.

Le CAM sublytique contribue également à l'acquisition d'un phénotype vasculaire prothrombotique en activant, notamment, les plaquettes et les cellules endothéliales : il induit la sécrétion, par ces cellules, de multimères de haut poids moléculaire du FvW et de P-selectine^{62,63} ; il stimule la synthèse endothéliale de facteur tissulaire, qui s'accompagne d'une augmentation de facteur X activé⁶⁴ ; il induit une réorganisation de leurs phospholipides membranaires, créant un environnement favorable à la coagulation ; il favorise la vésiculation des membranes endothéliales et plaquettaires à l'origine de microparticules riches, notamment, en facteurs Va et VIIIa nécessaires à la génération des complexes prothrombinase et tenase^{65,66} ; le CAM peut également catalyser la prothrombine en l'absence de facteur V⁶⁷ ; enfin, il peut induire une rétraction cellulaire (« gap » intercellulaire), susceptible d'exposer la matrice sous-endothéliale aux fortes propriétés prothrombotiques⁶⁸.

Par ailleurs, à concentration sublytique, le C5b-9 est également impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose^{69,70}.

Fonctions du C5b-9 soluble

Le C5b-9 soluble, issu d'un assemblage du CAM en phase fluide, ne peut s'insérer dans les membranes et n'a donc pas d'effet cytolytique direct. Il a, néanmoins, été montré que ce complexe pouvait induire une augmentation de l'expression de facteur tissulaire et de molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1, E-selectine) à la surface des cellules

endothéliales⁶⁰, favoriser le recrutement et la migration trans-endothéliale des neutrophiles⁶¹ et augmenter la perméabilité vasculaire⁷¹.

1.2.3 Rôles des opsonines

Certaines protéines du complément interviennent, par mécanisme d'opsonisation, dans les processus de clairance des agents pathogènes, complexes immuns, antigènes, débris cellulaires et cellules apoptotiques, ainsi que dans les processus de présentation d'antigène, participant de cette façon à la modulation de la réponse immunitaire adaptative.

Ces fragments du complément, aux propriétés d'opsonines, sont principalement issus du clivage des protéines C3 et C4 et regroupent le C4b ainsi que le C3b et ses produits de dégradation, iC3b, C3dg et C3d. Les protéines de reconnaissance des voies classiques et lectine-dépendantes - C1q, MBL et ficolines- sont également susceptibles de jouer ce rôle. Les surfaces cibles opsonisées peuvent être reconnues par des récepteurs spécifiques portés notamment par les cellules phagocytaires. Ces récepteurs possèdent des spécificités de fonction et de distribution cellulaire, et sont principalement : le CR1 (CD35), également impliqué dans la régulation du complément et dont les caractéristiques seront détaillées dans la section 2.3.2 (p.44) ; les CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18), qui tous deux appartiennent à la famille des intégrines- β 2 et sont richement exprimés à la surface des neutrophiles et monocytes/macrophages, favorisant notamment leurs fonctions phagocytaires par la reconnaissance du iC3b⁷² ; la protéine CR2 (CD21), glycoprotéine transmembranaire, reconnaissant iC3b, C3d et C3dg, présente à la surface des lymphocytes B où elle est impliquée dans la réponse cellulaire à l'antigène (le CR2 est par contre absent des cellules phagocytaires) ; et le CR1g, récepteur de la superfamille des immunoglobulines, exprimé principalement à la surface des cellules hépatiques de Kupffer, qui reconnaît les fragments iC3b, C3b et C3c.

Figure n°4 : Les différents effecteurs du complément (adaptée de Dunkelberger et al, Cell Research, 2010) ⁴²

Il apparaît donc, au vu des propriétés proinflammatoires et prothrombotiques des différents effecteurs du complément, de leur interaction avec les cellules endothéliales, leucocytes et plaquettes, que l'activation excessive de ce système puisse fortement contribuer au développement des lésions de microangiopathie thrombotique observées dans le syndrome hémolytique et urémique atypique, prototype de pathologie liée à une dysrégulation de la voie alterne du complément.

2. Etude centrée sur la voie alterne

La voie alterne est la plus ancienne voie d'activation du complément du point de vue phylogénique⁷³ et quantitativement la plus importante⁷⁴. Cette section portera sur les particularités de cette voie en détaillant d'une part, les mécanismes et acteurs aptes à l'initier et d'autre part, les protéines impliquées dans sa régulation.

2.1 La protéine C3

Le C3 est la protéine centrale du système du complément et le principal acteur de la voie alterne. Il appartient, tout comme C4 et C5, à la famille des α 2macroglobulines. Son gène, composé de 42 exons, est situé sur le chromosome 19 (19p13) et code pour une glycoprotéine plasmatique abondante ($\approx 1\text{g/L}$) de synthèse majoritairement hépatique⁷⁵.

Une synthèse extra-hépatique de C3 a également été décrite au sein d'autres cellules, parmi lesquelles les monocytes/macrophages^{76,77}, les polynucléaires neutrophiles⁷⁸ et les cellules endothéliales⁷⁹. Le rein constitue, en particulier, un site important de production de C3⁸⁰, par les cellules épithéliales tubulaires et glomérulaires⁸¹ ainsi que par les cellules endothéliales et mésangiales glomérulaires^{82,83}. Cette synthèse extra-hépatique, qui est majorée sous l'effet de cytokines proinflammatoires ($\text{TNF}\alpha$ ^{82,84}, $\text{IFN}\gamma$ ⁸³, $\text{IL-1}\beta$ ⁸⁵, IL-2 ⁸⁶) pourrait participer à une activation locale du complément. Un rôle de la production locale de C3 a ainsi été suggéré dans la physiopathologie de certaines pathologies rénales^{87,88}.

Le C3 est une glycoprotéine, composée de deux chaînes polypeptidiques, α (100 kDa) et β (75 kDa), reliées entre elles par un pont disulfure et organisées en 13 domaines, détaillés dans la figure n°5 (p.30). Sa structure tridimensionnelle a été précisée en 2005 par cristallographie⁸⁹.

Figure n°5 : Structure de la protéine C3 (adaptée de Janssen et al, Nature 2005)⁸⁹

Le C3 se compose de 13 domaines :

- de 8 domaines homologues nommés domaines macroglobulines (MG1 à 8) ;
- d'un domaine LNK (linker region) ;
- d'un domaine tetra-arginine proC3 processing ;
- d'un domaine ANA, qui générera après clivage le C3a ;
- d'un domaine CUB
- d'un domaine TED

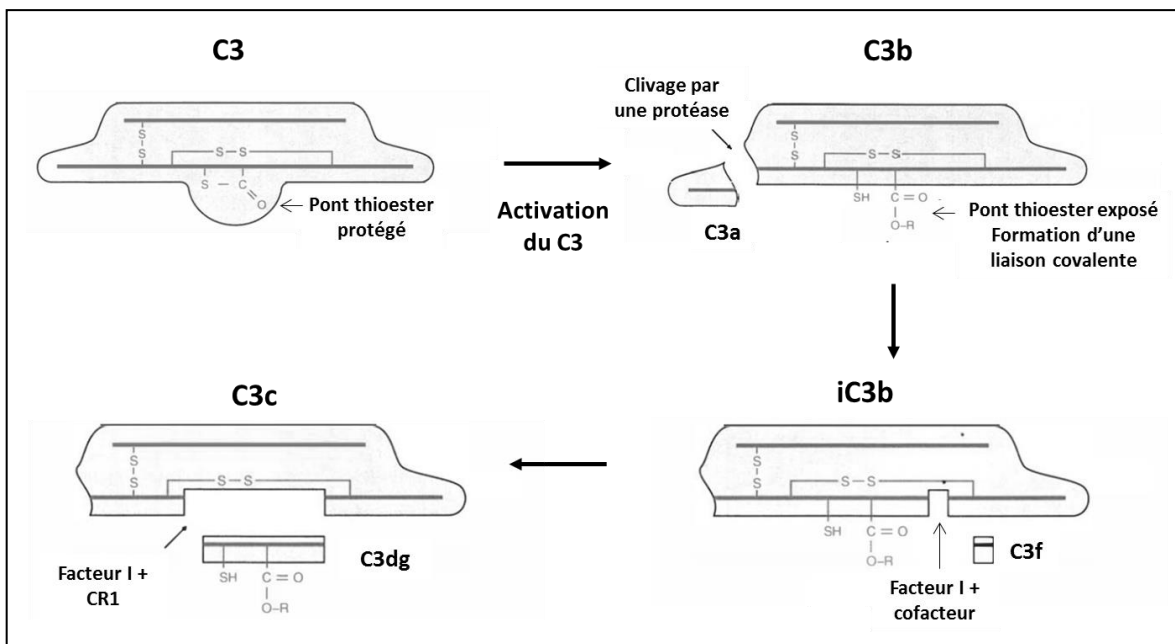
Les domaines CUB et TED généreront après clivage successif les fragments C3d, C3g et C3f.

Le domaine TED (thioester-containing-domain), situé sur la chaîne alpha, contient un groupement thioester hautement réactif, qui va permettre au C3b de se lier de façon covalente à ses ligands. Ce groupement est formé par une trans-estérification post-traductionnelle entre un résidu cystéine et un résidu glutamine. Il est internalisé au sein de la protéine native, protégé par les domaines macroglobulines, en particulier MG8^{89,90}.

Le clivage du C3 au niveau de ses résidus Ser726-Arg727, par hydrolyse spontanée ou protéolyse, induit la libération du domaine ANA, à l'origine de l'anaphylatoxine C3a. La perte de ce domaine s'accompagne de modifications conformationnelles du C3b ainsi formé, responsables notamment de l'exposition du groupement thioester hautement labile. Ce dernier peut alors former une liaison covalente de type ester avec une protéine environnante, porteuse d'un groupement réactif -OH. Il peut ainsi lier le FB et constituer, comme décrit précédemment, une C3 convertase alterne. Les changements de conformation induits par le clivage du domaine ANA, conduisent également à l'exposition

d'autres sites de fixation qui vont permettre au C3b d'interagir avec ses nombreux ligands, activateurs, régulateurs ou récepteurs. Sa liaison, notamment, à certaines protéines régulatrices du complément, aux fonctions de cofacteur du facteur I, va permettre sa protéolyse successive en iC3b puis C3dg. Le fragment C3dg peut ensuite être clivé par des enzymes tissulaires en C3d. Comme nous l'avons vu précédemment, ces fragments sont principalement impliqués dans l'opsonisation des surfaces cibles.

Figure n°6 : Représentation schématique des différentes étapes de clivage du C3



L'activation du C3 par clivage protéolytique génère la formation de C3a et C3b, dont le pont thioester devient alors exposé. Le C3b est ensuite dégradé en iC3b et C3f par l'action du FI en présence d'un cofacteur (FH, MCP, CR1 ou C4BP). Le iC3b est, lui, clivé en C3dg et C3c par le FI en présence de CR1.

2.2 Phase initiale de la voie alterne du complément

2.2.1 Le « tick-over »

A la différence des voies classique et lectine, la voie alterne est déclenchée par une hydrolyse spontanée du C3. Ce processus, désigné sous le terme de « tick-over »,

surviendrait à bas bruit de façon continue et permet à l'organisme une réactivité immédiate vis-à-vis des agents pathogènes. En effet, l'hydrolyse du C3 génère du C3(H₂O), capable de lier le fragment Bb du FB et donc de former en phase fluide une C3 convertase alterne initiatrice. Celle-ci peut cliver du C3 et générer du C3b qui, en cas de liaison non régulée à une surface activatrice, donnera lieu à la formation d'une C3 convertase alterne tissulaire et à l'activation du complément. Notons que le C3(H₂O) est, tout comme le C3b, soumis à régulation par le FI, formant ainsi du iC3(H₂O).

L'hypothèse du caractère spontané de cette hydrolyse ou « tick-over » a été introduite initialement pour expliquer la présence, en conditions natives, de C3b dans le plasma. Pangburn et al ont, en effet, mis en évidence, en l'absence de toute stimulation, une hydrolyse d'une petite fraction du C3 plasmatique, de l'ordre de 0,2 à 0,4%/heure¹⁸.

Le caractère spontané de cette hydrolyse du C3 est actuellement discuté. D'une part, les expériences initiales étaient réalisées, in vitro, avec du C3 purifié et donc en l'absence de régulateurs du complément; d'autre part, il est apparu que cette hydrolyse pouvait être accélérée par l'interaction du C3 avec différentes interfaces biologiques ou artificielles. De fait, certains auteurs considèrent actuellement le C3, non plus comme une molécule inerte sujette à l'hydrolyse, mais comme une protéine de contact, qui s'hydrolyse dans l'environnement d'éléments pathogènes ou autres surfaces activatrices^{91,92}.

2.2.2 Surfaces amorçant l'activation de la voie alterne du complément

Ainsi, la présence de C3(H₂O) a été mise en évidence sur différentes surfaces, suggérant qu'à leur contact le C3 puisse s'hydrolyser ou accélérer son hydrolyse spontanée. Ce faisant, ces surfaces constituent des sites déclencheurs de l'activation du complément par la voie alterne (figure n°7, p.34).

Plaquettes et microparticules plaquettaires

Il a été montré que les plaquettes activées pouvaient déclencher la cascade du complément par l'intermédiaire de la voie classique⁹³ et de la voie alterne⁹⁴.

L'activation des plaquettes, par la thrombine, le C3a ou le contact avec le collagène de la matrice sous-endothéliale (brèche vasculaire) ou le facteur de von Willebrand, induit le relargage du contenu de leurs granules α ^{95,96}. Celles-ci sont notamment riches en composants du complément - C3, FD, FH, clusterin - ainsi qu'en P-selectine (CD62)^{97,98}. Cette dernière est une protéine d'adhérence, stockée dans les granules α plaquettaires et dans les corps de Weibel-Palade endothéliaux, rapidement sécrétée après activation de ces cellules et qui intervient notamment dans la diapédèse leucocytaire. En 2005, Del conde et al ont rapporté, in vitro, que la P-selectine plaquettaire était fortement impliquée dans l'activation de la voie alterne observée à la surface des plaquettes activées. Les auteurs ont suggéré pour mécanisme la liaison du C3b à la P-selectine⁹⁴. Secondairement, la caractérisation des fractions C3 liées aux plaquettes a permis de montrer que la P-selectine liait également le C3(H₂O), et ce plus fortement que le C3b^{91,99}. Ainsi les plaquettes activées apparaissent capable d'initier la voie alterne, rendant compte d'une activation rapide du complément au niveau des thrombi.

Les mêmes capacités d'activation ont été rapportées pour les microparticules plaquettaires. Ces vésicules de petite taille issues des membranes plaquettaires sont impliquées dans l'inflammation¹⁰⁰ et dans l'hémostase avec une activité procoagulante 50 à 100 fois supérieure à celle des plaquettes activées¹⁰¹. Elles disposent également à leur surface de P-selectine¹⁰² et de récepteurs gC1qR/p33, qui leur permettent d'activer respectivement les voies alterne⁹⁴ et classique¹⁰³, selon des mécanismes similaires à ceux rapportés à la surface des plaquettes.

Plaquettes et microparticules plaquettaires sont, de fait, richement pourvues en régulateur du complément (DAF, CD59, clusterin)¹⁰³. Le FH peut également se lier aux plaquettes activées via les intégrines et glycoprotéines plaquettaires, α IIb- β III et GpIIb-IIIa^{104,105} ou via la thrombospondin-1¹⁰⁶.

Les Biomatériaux

L'activation de la voie alterne en cas d'exposition du plasma à des biomatériaux (circuits de circulation extracorporelle, cathéters, prothèses cardiaques ou vasculaires) est depuis longtemps connue^{107,108}. Cette activation est en partie dépendante des voies classique et lectine¹⁰⁹ qui activent indirectement la voie alterne via la boucle d'amplification, mais il a

également été montré que ces surfaces adsorbent le C3 avec pour conséquence une activation directe de la voie alterne. En effet, cette adsorption modifie la conformation du C3, libérant son domaine thioester, à la manière du C3b. Ce C3 adsorbé est ainsi capable de lancer l'assemblage d'une C3 convertase alterne et d'activer le complément^{110,111}.

Les surfaces gazeuses

Il a été montré que l'interaction entre gaz (oxygène, air, nitrogène) et plasma, qui en pratique peut s'observer lors de l'oxygénation sanguine dans les bypass cardiopulmonaires, induit également une activation du complément¹¹². Cette activation est la conséquence de la génération de C3(H₂O) à l'interface fluide/gaz selon un mécanisme proche de celui observé sur les biomatériaux⁹¹.

Les surfaces lipidiques

Une activation de la voie alterne a été rapportée sur des modèles de liposomes ou micelles¹¹³, suggérant une capacité du C3 à s'hydrolyser au contact de certaines surfaces lipidiques, particulièrement lorsqu'elles sont riches en phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine^{114,115}. Ce mécanisme expliquerait en partie l'activation du complément par la voie alterne à la surface des érythrocytes drépanocytaires désoxygénés ainsi qu'à celle des cellules apoptotiques, où survient une redistribution des phospholipides entre les faces internes et externes de la membrane plasmique, responsable d'une surexposition notamment de phosphatidylsérine^{69,115}.

*Figure n°7 : Surfaces initiatrices de la voie alterne du complément (adaptée de Nilsson et al, Immunobiology, 2012)*⁹¹

2.2.3 La properdine

Le défaut de régulation constitue le mécanisme traditionnellement retenu pour expliquer l'activation du complément après liaison du C3b à ses surfaces cibles. Ce mécanisme est notamment impliqué dans l'apoptose, les cellules apoptotiques se caractérisant, en effet, par une diminution de l'expression de plusieurs régulateurs membranaires (MCP, DAF, CD59)⁶⁹. Plus récemment, d'autres mécanismes ont été rapportés, impliquant en particulier la properdine.

La properdine est une protéine circulante, dont le gène est situé sur le bras court du chromosome X. Elle se compose de 1 à 4 sous-unités identiques de 53kDa, chargées positivement. Chaque sous-unité est formée de six domaines TSR (thrombospondin type I repeat: TSR-1 to TSR-6) et d'un domaine N-terminal¹¹⁶. Sa concentration est de l'ordre de 4 à 6 µg/ml dans le plasma, où elle évolue sous forme di, tri ou tétramérique, cette dernière étant la plus fonctionnelle¹¹⁷. Elle est majoritairement synthétisée par les monocytes, les lymphocytes T¹¹⁸ ainsi que par les neutrophiles, où elle est alors stockée dans des granules et rapidement libérée après stimulation¹¹⁹.

D'une part, la properdine constitue un régulateur positif de la voie alterne : en se liant au C3b, elle limite son clivage protéolytique par le FI et elle stabilise les complexes C3bB et C3bBb¹²⁰. Elle augmente ainsi de 5 à 10 fois la demi-vie de la C3 convertase alterne¹²¹, qui est autrement d'environ 90 secondes^{122,123}. Même si l'activité fonctionnelle de la C3 convertase peut être obtenue en l'absence de properdine¹²³, son importance est suggérée chez les patients génétiquement déficitaires en properdine, sujets aux infections à méningocoques de façon similaire qu'en cas de déficit en C3¹²⁴.

D'autre part, la properdine pourrait directement participer à l'activation de la voie alterne, concept reprenant l'hypothèse, initialement décrite, du «système de la properdine» proposé par Pillemer et al en 1954. En effet, en 2006, Hourcade et al ont montré in vitro que la properdine fixée à une surface pouvait, en présence de magnésium, lier le C3b et constituer une plateforme pour l'assemblage d'une C3 convertase alterne^{120,125}. Les auteurs suggèrent que la properdine, via sa liaison initiale à des cibles spécifiques, pourrait ainsi activer la voie alterne de façon plus spécifique.

Ce mécanisme est notamment impliqué dans l'activation de la voie alterne observée à la surface des cellules apoptotiques¹²⁶, où les molécules de C3b et iC3b ainsi générées pourraient favoriser secondairement la phagocytose de ces cellules¹²⁷, ainsi qu'à la surface des polynucléaires neutrophiles activés¹²⁸. La reconnaissance par la properdine de ses surfaces cibles pourrait être dépendante des glycosaminoglycanes membranaires¹²⁹.

Figure n°8 : Fonctions de la properdine au sein de la voie alterne du complément (adaptée de Spitzer et al, Journal of Immunology 2007)¹²⁵

2.2.4 Autres mécanismes d'activation de la voie alterne

La boucle d'amplification

La voie alterne peut aussi être activée indirectement par les autres voies d'activation du complément, pour lesquelles la voie alterne représente une boucle d'amplification de la cascade du complément. Les molécules de C3b générées par la C3 convertase classique, après activation des voies classique ou lectine-dépendante, peuvent elles aussi interagir avec le FB et aboutir à la formation de C3 convertases alternes¹³⁰. Par l'intermédiaire de cette boucle d'amplification, la densité de C3b sur les surface-cibles augmente, formant, en l'absence de régulation autant de C3 convertases alternes qui, à leur tour, vont générer du C3b par clivage du C3. Ainsi, il a été montré que la voie alterne contribuait pour 80% à la

formation du C5a et du C5b-9, dans le cadre d'une activation initiale et spécifique de la voie classique¹³¹.

Activation par la voie lectine (Lectin C2 bypass pathway)

Selander et al ont montré in vitro que les résidus MBL fixé à leur cible pouvaient, en cas de déficit en C2, activer la voie alterne¹³². Ce mécanisme aurait pour particularité d'être peu sensible à l'inactivation par le facteur H et le facteur I. Le rôle physiologique de cette voie, en dehors des cas de déficiences en C2, reste à préciser.

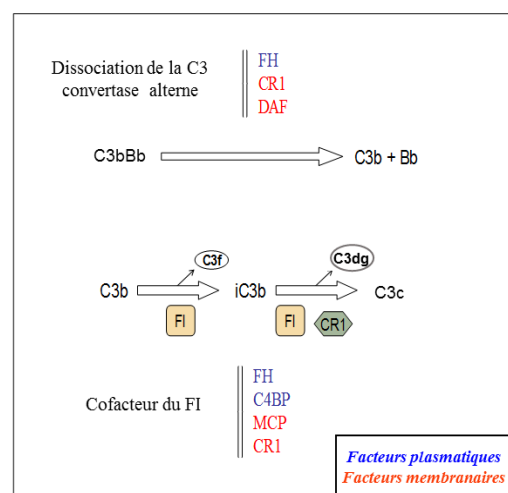
Activation par les IgG

En phase fluide, deux molécules de C3b peuvent se complexer à une IgG, pour former des complexes C3b₂-IgG, qui pourraient servir de plateforme à la formation d'une C3 convertase alterne. Ce complexe présenterait quelques spécificités : d'une part, sa liaison à la properdine précèderait celle au FB et sa demi-vie serait de fait supérieure à celle du C3b libre ; d'autre part, la C3 convertase générée à partir de ce complexe serait plus résistante à l'action régulatrices des facteurs I (FI) et H (FH)²⁴.

2.3 Régulation de la voie alterne du complément

Le complément est un système puissant mais peu spécifique, qui requiert donc d'être finement régulé. Il existe ainsi un réseau de protéines régulatrices solubles et/ou membranaires, qui agissent via deux modes d'action principaux (figure n°9), en favorisant la dissociation de la C3 convertase alterne ou en tant que cofacteur du FI pour la dégradation du C3b. Il est probable que cette redondance de fonctions, serve à « sécuriser » la régulation de ce système et à pallier l'éventuelle défaillance d'une des protéines.

Figure n°9 : Régulation de la voie alterne du complément



2.3.1 Régulateurs plasmatiques de la voie alterne

Le Facteur H

Découvert en 1965¹³³, le FH est considéré comme la principale protéine de régulation de la voie alterne du complément^{134,135}.

Cette protéine est codée à partir du gène *CFH*, composé de 23 exons et situé sur le chromosome 1 (1q32), au sein du locus RCA (Regulator of Complement Activation), dénommé ainsi car 15 de ses 61 gènes codent pour des protéines de régulation du complément¹³⁶.

La structure primaire du FH est simple, ses 1213 acides aminés forment une chaîne de 150 kDa, composée de 20 modules similaires, appelés SCR (Short Consensus Repeat) ou CCP (Complement-control protein module), constitué chacun d'une courte séquence d'environ 60 à 70 résidus. Chaque SCR s'organise en feuillets β et en une boucle hypervariable. Celle-ci forme une structure ellipsoïde, observée en analyse tridimensionnelle, au sein de laquelle peuvent venir se lier différents ligands^{137,138}. La variabilité des propriétés structurales de cette boucle confère la spécificité de ligands d'un SCR à un autre¹³⁹. Le FH est une protéine, par ailleurs, hautement glycosylée, sans que cette glycosylation n'ait, semble-t-il, d'incidence sur ses fonctions¹⁴⁰.

Le FH est une protéine circulante dont la concentration plasmatique physiologique est d'environ 500mg/L. Il est majoritairement et constitutivement sécrété par les hépatocytes mais peut être exprimé localement par différents types cellulaires, notamment les cellules endothéliales (HUVEC)¹⁴¹, les plaquettes¹⁴², les cellules épithéliales rétiniennes¹⁴³ ou mésangiales glomérulaires¹⁴⁴, synthèse induite notamment par l'IFN γ ^{141,144}. Elle permettrait de moduler localement la concentration de FH, renforçant ainsi au besoin la protection des cellules hôtes vis-à-vis d'un complément activé.

Une des particularités du FH est de réguler la voie alterne du complément aussi bien en phase fluide¹⁴⁵ qu'à la surface des cellules¹⁴⁶. En effet, il a été montré qu'en l'absence de FH dans le plasma, il survenait une activation spontanée de la voie alterne, se traduisant par une consommation des FB et C3. D'autre part, le FH est capable de se lier à des surfaces riches en glycosaminoglycanes (GAG). Il participe ainsi à la discrimination entre

agents pathogènes et cellules hôtes, qui sont riches en GAG, protégeant ces dernières de l'activation du complément¹⁴⁶.

Le FH a trois fonctions de régulation, portées par ses SCR1-4, dans sa région N-terminale :

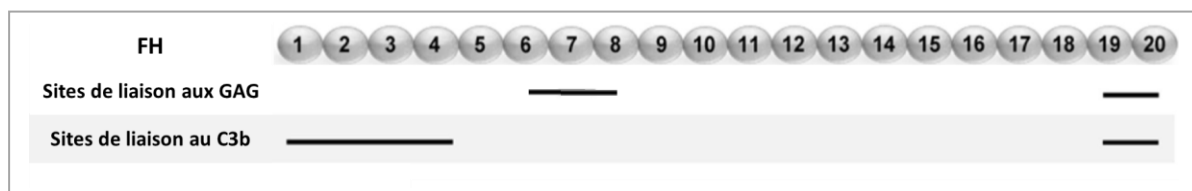
i/ il entre en compétition avec le FB pour la liaison au C3b et peut ainsi prévenir la formation de la C3 convertase en phase fluide et à la surface des cellules hôtes¹⁴⁷ ;

ii/ il constitue un des cofacteurs du FI: la liaison C3b-FH sert de plateforme de fixation au FI qui peut alors cliver le C3b en iC3b¹⁴⁸. Le FI se fixe, d'ailleurs, au C3b lié au FH avec plus d'affinité qu'au C3b isolé¹⁴⁹;

iii/ il accélère la dissociation irréversible de la C3 convertase alterne par déplacement du fragment Bb¹⁵⁰.

Le FH possède de multiples sites de liaisons, qui sont distribués sur ses différents SCR et qui « collaborent » entre eux¹³⁴. Ses deux principaux ligands sont le C3b et les GAG, pour qui il possède plusieurs sites de liaison (figure n°10).

Figure n°10 : Les principaux sites de liaison du FH avec le C3b et les GAG



Le FH peut lier le C3b via, d'une part ses SCRs 1-4, par lesquels il exerce les fonctions de régulation décrites ci-dessus, et d'autre part ses SCRs 19-20. Les SCRs 19-20 ont une forte affinité (K_D 2-4 μM) pour le C3b immobilisé, et ce de façon plus marquée à la surface des cellules de l'hôte qu'à celle des agents pathogènes¹⁵¹. Cette affinité FH-C3b serait renforcée par l'environnement riche en GAG des cellules de l'hôte¹⁴⁶. En effet, les SCRs 19-20 constituent également le principal site de liaison du FH aux GAG membranaires (K_D 5-10 μM). Ils partagent cette fonction avec les SCR 6-8^{152,153}, de façon présumée synergique¹⁵⁴. Le FH peut également lier d'autres ligands, tels que les plaquettes par ses SCRs 19-20¹⁰⁵, la pentraxin 3¹⁵⁵, l'ADN, les histones, l'annexin II¹⁵⁶, ainsi que des marqueurs de stress oxydatifs ou d'inflammation comme la CRP¹⁵⁷, le malondialdéhyde acétaldéhyde¹⁵⁸ ou les lipides oxydés¹⁵⁹. Le recrutement du FH à la surface de cellules souffrantes peut avoir deux

intérêts, d'une part limiter la lyse cellulaire par le CAM et ainsi empêcher la nécrose cellulaire qui est immunogène et d'autre part, promouvoir la formation de iC3b pour faciliter la clairance de ces cellules par les phagocytes.

Le FH circule majoritairement sous forme monomérique, mais une oligomérisation a été rapportée au contact de surfaces polyanioniques¹⁶⁰ et il a été montré qu'une molécule d'héparine pouvait lier plusieurs molécules de FH¹⁶¹. Les GAG pourraient influencer les caractéristiques électrostatiques du FH, modifier son architecture et entraîner ainsi une exposition de sites de liaison normalement cryptiques¹⁶². Une des hypothèses actuelles propose qu'en phase fluide, le FH circule sous une forme compactée qui n'expose pas l'ensemble de ces sites d'interaction, ce qui ne gêne pas le contrôle plasmatique de l'amplification de la voie alterne, tandis qu'à la surface des cellules, sous l'influence des GAG, il libère d'autres sites fonctionnels lui autorisant plus de liaisons.

Les protéines apparentées au FH

CFHL-1

Le CFHL-1 (Complement Factor H Like protein) est issue d'un épissage alternatif de l'ARNm du FH et se compose des SCR1-7, dont seuls les 4 acides aminés C-terminaux sont spécifiques¹⁶³. Il s'agit d'une protéine circulante (10-50ug/ml) qui partage avec le FH ses fonctions de régulation du complément en phase fluide via ses SCRs 1-4 (cofacteur du FI et dissociation des C3 convertases)¹⁶⁴. Il possède également un site de liaison à l'héparine localisé sur son SCR7¹⁵².

CFHR

À proximité du gène du FH sont situés cinq gènes codant pour des protéines apparentées présentant une forte homologie avec le FH : les CFHR1 à 5 (Complement Factor H Related Proteins). Leurs spécificités structurelles sont comparées à celle du FH dans la figure n°11 (p.41). L'état des connaissances sur leurs fonctions, encore mal identifiées, a récemment fait l'objet d'une revue¹⁶⁵ et actuellement sont donc rapportés :

- pour le CFHR1 : une capacité à lier l'héparine et le C3b par ses SCR3-5 qui ont une très forte homologie avec les SCR18-20 du FH, ce qui lui permettrait d'inhiber la formation de

C5 convertases et de CAM¹⁶⁶. Le CFHR1 pourrait également être en compétition avec le FH pour la liaison au C3b¹⁶⁷.

- pour le CFHR2 : une capacité à lier le C3b par ses domaines SCR3-4, ce qui participerait à réguler la C3 convertase.
- pour le CFHR3 et pour le CFHR4 : une capacité à lier le C3b et le C3d¹⁶⁸. Une compétition avec le FH pour la liaison au C3b a été rapportée pour le CFHR3¹⁶⁷.
- pour le CFHR5 : une capacité à lier l'héparine par ses SCR5-7 (forte homologie avec les SCR12-14 du FH), la CRP ainsi que le C3b permettant, à haute concentration, une activité de cofacteur du FI et de dissociation de la C3 convertase¹⁶⁹. Il entrerait en compétition avec le FH pour sa liaison au C3b.

Figure n°11 : Le facteur H et ses protéines apparentées (adaptée de Makou et al., Biochemistry, 2013)¹³⁴.

Le Facteur I

Le FI est une enzyme de la famille des protéases à sérine, qui participe à la régulation des voies alternes et classiques du complément en clivant respectivement le C3b et le C4b.

Son gène, situé sur le chromosome 4 (4q25), se compose de 13 exons, dont l'expression aboutit à une glycoprotéine de 88 kDa, hétérodimérique, constituée d'une chaîne lourde (58kDa) et d'une chaîne légère (30kDa) unies par un pont disulfure. La fonction sérine protéase est portée par la chaîne légère dans laquelle se situe la triade catalytique

caractéristique, histidine-aspartate-sérine. La chaîne lourde est, elle, composée de plusieurs domaines : un domaine récepteur de SCR (ou domaine CD5) qui permettrait la liaison du FI à ses cofacteurs ainsi qu'un domaine FIMAC (Factor I and membrane attack complex) et deux domaines d'homologie aux récepteurs des LDL, dont les fonctions ne sont actuellement pas définies¹⁷⁰.

La concentration plasmatique du FI est d'environ 35 mg/l et augmente au cours des processus inflammatoires, notamment in vitro sous l'effet de l'IL-6 ou de l'IFN γ ^{171,172}. Sa sécrétion est majoritairement hépatique mais d'autres types cellulaires peuvent également l'exprimer (HUVECs, monocytes, fibroblastes et kératinocytes)¹⁷⁰⁻¹⁷².

A la différence de la majorité des protéases à sérine qui circulent sous forme de proenzymes inactives, le FI, tout comme le FD, évolue dans le plasma sous forme active. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces deux enzymes requièrent pour fonctionner que leur substrat se soit préalablement complexé avec une autre protéine. Dans le cas du FI, son activité protéolytique nécessite l'intervention d'autres protéines de régulation du complément en tant que cofacteurs: MCP et CR1 participent ainsi à l'inactivation du C3b et du C4b tandis que les FH et C4BP sont eux plus spécifiques d'une voie, alterne dans le premier cas et classique dans le second. Tant que le complexe cofacteur-substrat n'est pas formé, l'affinité du FI pour son substrat reste faible. Lorsque le C3b est lié à l'un de ses cofacteurs, le FI peut alors le cliver au niveau d'un résidu arginine, libérant un petit fragment de 3 kDa, le C3f et un fragment inactif de 186 kDa, le iC3b¹⁴⁸ (figure n°6, p.31). Ce dernier ne peut plus lier le FB mais reste fixé aux membranes cellulaires, où il peut jouer le rôle d'opsonine.

La C4BP

La C4BP (C4 Binding Protein), dont le gène se situe dans le locus RCA, est une glycoprotéine plasmatique composée de plusieurs chaînes polypeptidiques (7 chaînes α et une chaîne β) porteuses notamment de domaines SCR. Cette protéine participe essentiellement à la régulation des voies classique et lectine-dépendante, via sa fonction de cofacteur du FI pour l'inactivation protéolytique du C4b¹⁷³ ainsi que par son activité de dissociation de la C3 convertase classique¹⁷⁴. Une activité cofacteur du FI pour le clivage du C3b a également été rapportée mais reste anecdotique, puisqu'en conditions in vitro, comparativement au

FH, environ 1000 fois plus de C4BP sont nécessaires pour observer le même niveau de production de iC3b¹⁷⁵.

2.3.2 Régulateurs membranaires de la voie alterne

La protéine MCP

La MCP (Membrane Cofactor Protein) ou CD46 est une glycoprotéine transmembranaire, présente sous 4 isoformes de 51 à 68 kDa issus d'épissages alternatifs, qui cohabitent à la surface d'une même cellule.

Son gène est localisé dans le locus RCA et se compose de 14 exons, qui codent pour: 4 domaines SCR (exons 2 à 6) ; 1 ou 2 domaines riche en sérine, threonine, proline dits STP (C ou B+C) qui définissent deux isoformes (exons 7 à 9) ; un domaine juxta-membranaire de taille constante qui jouxte un domaine hydrophobe transmembranaire (exons 10 à 12) ; et un domaine intra-cytoplasmique, CYT-1 ou CYT-2 (exons 13 et 14), donnant lieu également à deux isoformes de MCP, qui permettent la transduction de signaux vers des fonctions cellulaires différentes^{176,177}.

L'expression de MCP est ubiquitaire, elle est notamment retrouvée à la surface de toutes les cellules circulantes, à l'exception des érythrocytes¹⁷⁸. Son expression avec celle de DAF et CD59 peut être augmentée à la surface des cellules endothéliales par la CRP¹⁷⁹. Elle diminue, par contre, à la surface des cellules apoptotiques⁶⁹.

La MCP participe à la régulation des voies classique et alterne par ses fonctions de cofacteur du FI, avec un rôle néanmoins plus secondaire que celui du FH vis-à-vis du C3b¹⁸⁰. Ses sites de liaison pour les C4b et C3b sont localisés dans les SCR2-4, et plus spécifiquement dans le SCR4 pour le C3b¹⁸¹.

Depuis dix ans d'autres fonctions ont été attribuées à la MCP. Elle intervient notamment dans l'immunité adaptative en induisant, après costimulation de lymphocytes T CD4+ naïfs, leur prolifération et leur différenciation vers un phénotype T régulateur. Elle inhiberait, par ailleurs, la production d'IL-12 par les macrophages et l'activité des cellules NK¹⁸². Enfin, cette protéine est aussi impliquée dans la fertilité et peut constituer un récepteur pour certains pathogènes viraux ou bactériens¹⁷⁸.

La protéine DAF

DAF (Decay Accelerating Factor) ou CD55 est également codé à partir d'un gène situé sur le locus RCA. Il s'agit d'une glycoprotéine, de 70kDa, ancrée à la membrane par un domaine GPI (glycosylphosphatidylinositol) et composée de 4 SCRs. Cette protéine a également une expression ubiquitaire et participe, comme la MCP, à la régulation des voies classique et alterne, non pas par une activité cofacteur mais en accélérant la dissociation et en prévenant la formation de nouvelles C3 et C5 convertases¹⁸³. Cette activité est portée, pour la voie alterne par les SCR2-4 et pour la voie classique par les SCR2-3¹⁸⁴.

Une des particularités de DAF est de présenter un turn-over, à la surface des cellules, plus important que celui observé pour les autres protéines de régulation membranaire du complément. En effet, en cas d'inhibition de la synthèse protéique, son expression diminue de presque 50% à la surface des cellules endothéliales (HUVEC) en 24h, tandis que sa concentration dans le surnageant de culture augmente. Il s'agit donc d'un clivage membranaire, qui ne semble pas dépendre de la PIPLC (phosphatidylinositol-specific phospholipase C) puisque dans le même temps l'expression de CD59, également ancrée par GPI, n'est, elle, pas modifiée¹⁸⁵. Une autre particularité de DAF est d'être inductible par de nombreux stimuli. L'augmentation de son expression a ainsi été rapportée à la surface de cellules endothéliales sous l'effet notamment de cytokines pro-inflammatoires (IFN- β , TNF α)¹⁸⁶, de β -FGF (β -fibroblast growth factor)¹⁸⁷, d'histamine¹⁸⁵, d'hème-oxygénase¹⁸⁸, de VEGF (vascular endothelial growth factor)¹⁸⁹ ou de thrombine¹⁹⁰. Par ailleurs, tout comme MCP, DAF est un modulateur négatif de la réponse immune T¹⁹¹ et peut constituer un récepteur pour certains virus ou micro-organismes¹⁹².

La protéine CR1 (type 1 Complement Receptor)

Le CR1 (CD35 ou C3b/C4b récepteur) est une glycoprotéine transmembranaire composée d'une chaîne unique de 30 SCRs organisée en 3 à 6 LHRs (Long Homologous Repeat), dont le gène appartient également au locus RCA.

CR1 est exprimé à la surface de la majorité des cellules circulantes¹⁹³, en particulier sur les érythrocytes qui portent près de 90% du pool total de CR1¹⁷⁷. Au niveau tissulaire, le CR1 est retrouvé à la surface des podocytes glomérulaires¹⁹⁴, des astrocytes et des cellules des follicules dendritiques¹⁷⁷. Il n'est pas exprimé par les cellules endothéliales¹⁹⁵, de sorte que MCP constitue sur ces cellules le seul cofacteur membranaire du FI.

Le CR1 possède 3 sites de liaison au C4b et deux au C3b. Il partage à la fois les fonctions de DAF et MCP et participe donc à la régulation du complément en tant que cofacteur du FI pour le clivage du C3b et du C4b¹⁹⁶ et en accélérant la dissociation des C3 et C5 convertases alterne et classique¹⁹⁷. D'autre part, il est le seul cofacteur du FI pour le clivage du iC3b, à l'origine de C3dg¹⁹⁶, ligand du récepteur CR2 présent à la surface des lymphocytes B¹⁹⁸.

Le CR1, en tant que récepteur des opsonines C3b et C4b, intervient également dans la clairance des complexes immuns et autres particules. Ces complexes immuns ou particules transistent, complexés au CR1 des érythrocytes essentiellement, jusqu'au foie ou à la rate où ils sont phagocytés par les macrophages¹⁹⁹.

2.3.3 Régulateurs de la voie terminale commune

Le complexe d'attaque membranaire est sous la régulation de 4 protéines :

- La vitronectine (protéine S) et le SP-40 (clusterine) qui inhibent la formation du CAM en liant C5b-7, C5b-8, C5b-9 ;
- Les récepteurs HRF (Homologous Restriction Factor) regroupant le CD59 et le C8bp (C8 binding protein) qui bloquent la polymérisation des molécules et donc la formation du CAM.

Parmi elles, le CD59 (ou MIRL : Membrane inhibitor of reactive lysis), constitue une quatrième protéine de régulation membranaire du complément, dont l'expression est souvent étudiée, de façon concomitante à celles de DAF, MCP et CR1.

Son gène n'est pas situé dans le locus RCA mais sur le chromosome 11, rendant compte d'une structure protéique ne comptant pas de SCR. Il s'agit d'une glycoprotéine de petite taille (20 kDa) ancrée, tout comme DAF, à la membrane par un domaine GPI. CD59 est exprimé à la surface de la plupart des tissus et sur toutes les cellules circulantes²⁰⁰. Il intervient dans la régulation du complément en liant le complexe C5b-8 ainsi que C9, bloquant ainsi la formation du canal transmembranaire et la lyse cellulaire^{201,202}. Son rôle apparaît critique notamment à travers l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN). Cette pathologie secondaire à une mutation touchant les cellules hématopoïétiques, se

caractérise par l'existence de clones, notamment érythrocytaires, déficitaires en protéines ancrées par GPI, soit en CD55 et CD59. Ceci induit une susceptibilité des globules rouges à l'hémolyse complément-dépendante, responsable du tableau clinique associant anémie hémolytique, hémoglobinurie +/- thromboses. Bien que CD55 et CD59 soient tous deux absents, il est apparu, via des modèles murins, que le rôle de CD59 était prépondérant. De même, les patients avec un déficit isolé en DAF ne sont pas symptomatiques^{203,204} à la différence des patients avec un déficit isolé en CD59²⁰⁵.

Par ailleurs, le CD59 est également impliqué dans l'activation des neutrophiles, l'activation lymphocytaire T et B et l'induction des cellules NK²⁰⁶.

Le complément est donc un système complexe, finement régulé, aux multiples fonctions et interactions qui, équilibré, participe de façon essentiel au maintien de l'homéostasie. A l'inverse, sa dysfonction est impliquée dans de nombreuses pathologies. Les déficits en C3, properdine ou composants de la voie terminale exposent ainsi les patients à un sur-risque infectieux, en particulier à bactéries encapsulées. Cependant, ce sont actuellement plus sur les conséquences de l'activation excessive du complément, en particulier de la voie alterne, que se concentrent les recherches. En effet, l'implication de la voie alterne du complément est suspectée dans un grand nombre de pathologies²⁰⁷, dont certaines constituent des enjeux de santé publique dans les pays occidentaux, telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou l'athérosclérose. Dans ce sens, le SHUa, prototype de pathologie liée à une dérégulation du complément, comme le suggère l'identification fréquente chez les patients de mutations intéressant ce système ainsi que les résultats prometteurs récemment observés en cas de traitement par Eculizumab (anticorps monoclonal anti-C5)²⁰⁸, constitue un modèle d'étude intéressant. Le prochain chapitre sera donc dédié à cette pathologie ainsi qu'aux autres facteurs étiologiques impliqués dans le développement des microangiopathies thrombotiques.

Chapitre 2 : Le syndrome hémolytique et urémique

Le diagnostic d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU) repose, indépendamment du facteur étiologique en cause, sur la coexistence d'une insuffisance rénale aigue, d'une thrombopénie et d'une anémie hémolytique mécanique.

Cette terminologie a été proposée en 1955 par l'hématologue Von Gasser, qui décrit pour la première fois cette triade biologique chez 5 enfants²⁰⁹.

Ce syndrome est la traduction clinique du développement, dans les vaisseaux rénaux de petits calibres (artérioles et capillaires glomérulaires), de lésions de microangiopathie thrombotique (MAT)²¹⁰. Ces lésions histologiques, qui par définition atteignent les vaisseaux de diamètre inférieur à 200µm, se caractérisent par un élargissement de l'espace sous-endothélial associé à une congestion et une turgescence des cellules endothéliales qui bombent puis se détachent dans la lumière des micro-vaisseaux, ainsi que par le développement de thrombi fibrino-plaquettaires intra-luminales²¹¹. La conjonction de ces lésions aboutit à l'obstruction partielle ou complète des microvaisseaux, mécanisme rendu responsable de la triade -insuffisance d'organe, thrombopénie, anémie hémolytique- reflet respectif d'une ischémie tissulaire d'aval, d'une consommation plaquettaire et d'une lyse mécanique des globules rouges²¹².

Le SHU est donc une MAT à tropisme rénal, cependant les lésions de MAT ne sont pas spécifiques de ce syndrome. Elles peuvent se rencontrer dans d'autres tableaux sémiologiques, qui, en fonction de la présentation clinique prédominante, ont pu hériter de noms différents. Ainsi, le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est une MAT où prédominent classiquement les symptômes neurologiques, le HELLP (Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count) syndrome, observé dans le peri-partum, est une MAT caractérisée par une souffrance hépatique. Des lésions de MAT peuvent également s'observer dans différentes circonstances (pathologies tumorales, transplantation, pathologies auto-immunes, etc..) avec des atteintes d'organes variables²¹³. Cette même entité histologique peut donc s'exprimer par un large spectre de tableaux clinico-biologiques, qui sont susceptibles de se chevaucher, rendant parfois leur distinction

difficile. Cette nomenclature a d'ailleurs été source de controverse sur la classification clinique des patients, ce qui a pu compliquer l'analyse de certaines données. Les progrès majeurs réalisés, ces dernières années, dans la compréhension de la physiopathologie des MAT, ont permis de mieux appréhender les mécanismes par lesquels ces lésions se développent. La découverte de plusieurs facteurs étiologiques différents a participé à identifier des pathologies distinctes, qui ne se définissent non plus par leur expression syndromique mais par leur origine physiopathologique. Ainsi, cette approche mécanistique a permis d'ébaucher une nouvelle classification, initialement proposée, en 2006, par l'*European Paediatric Resaerch Group for HUS*²¹⁴ (annexe n°2, p.186). Cette classification distingue et répertorie, d'une part les tableaux de MAT associés à un facteur étiologique connu et d'autre part ceux pour lesquels les mécanismes conduisant au développement des lésions de MAT ne sont pas encore identifiés^{214,215}. Les découvertes, dans l'avenir, d'autres facteurs endogènes (cellulaires, moléculaires) ou exogènes (infectieux, toxiques ou autres) seront susceptibles de faire évoluer cette classification, condition indispensable à l'optimisation de la prise en charge thérapeutique des patients. Cette approche a d'ores et déjà permis de développer des stratégies thérapeutiques ciblées et donc plus efficaces en fonction du mécanisme physiopathologique mis en cause.

Parmi les mécanismes physiopathologiques identifiés, les anomalies de régulation du complément tiennent une place essentielle. En effet, elles constituent le principal facteur de susceptibilité connu des SHU dits atypiques (définis par l'absence de Shiga-toxines), où elles sont mises en évidence chez plus de 60% des patients²¹⁶. A ce titre, le SHUa est devenu le prototype d'une maladie secondaire à un défaut de contrôle de l'activation du complément et constitue un modèle d'étude de la dysfonction endothéliale aigue complément-dépendante.

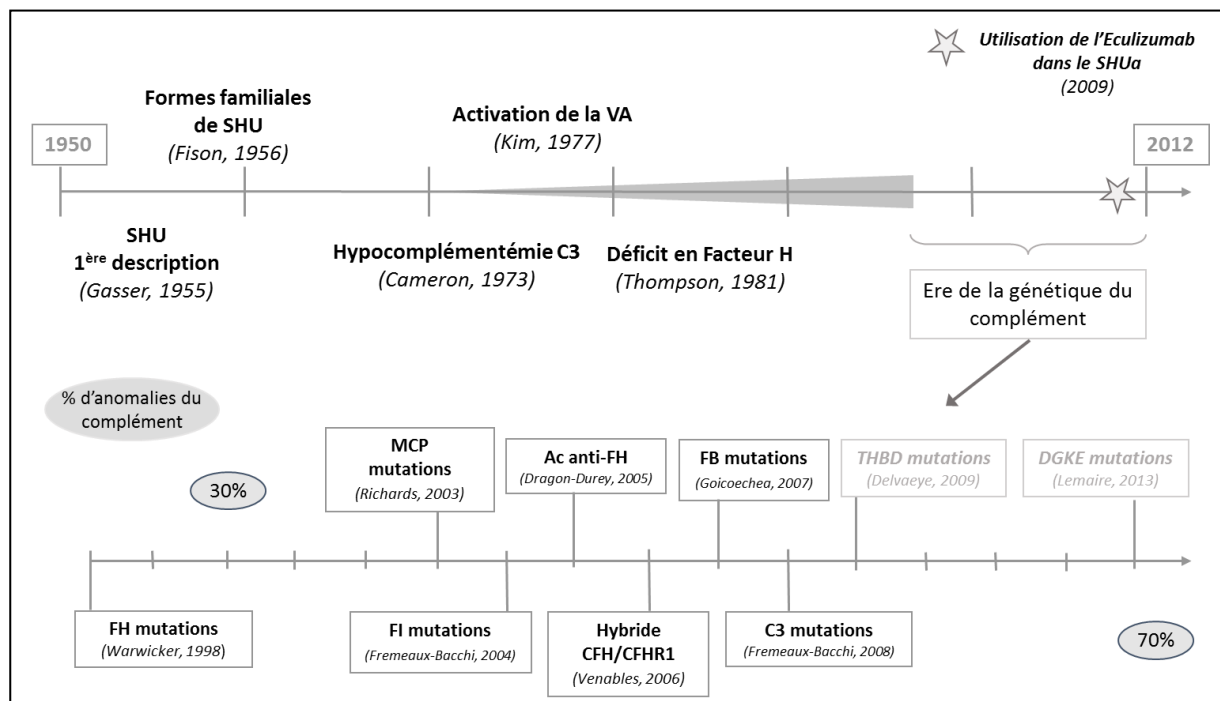
L'objectif de ce chapitre, outre de présenter le modèle pathologique sur lequel s'est concentré mon travail de thèse, est d'étudier la place du complément dans les autres formes de SHU, dans le but d'appréhender le complément non plus seulement comme un facteur de susceptibilité mais comme un acteur de la constitution des lésions de MAT, quel qu'en soit le mécanisme initiateur.

1. Le SHU associé à des anomalies de régulation du complément

1.1 Historique : Emergence du rôle du complément

Le rôle du complément dans le SHU est apparu progressivement après 1970, jusqu'à devenir essentiel ces 15 dernières années.

Figure n°12 : Emergence du rôle du complément dans le SHU



Historiquement, les nombreux cas rapportés de SHU dans les années 60-70, dans les suites de la description initiale de Gasser, ont conduit à distinguer deux formes de SHU, et ce compte tenu de la constatation d'une présentation clinique et d'un pronostic différents selon les patients²¹⁷ : d'une part, les SHU dits typiques ou post-diarrhéiques (SHU-D⁺) survenant préférentiellement chez l'enfant sous forme de petites épidémies, précédés de diarrhées, d'évolution le plus souvent favorable, notamment marqués par l'absence de rechutes ; d'autre part, les SHU sans syndrome diarrhéique (SHU-D⁻) dits atypiques, moins communs, sporadiques ou familiaux, pouvant survenir à tout âge, avec une présentation

clinique plus hétérogène et une évolution nettement plus péjorative. Kaplan et al proposa, dès 1975, une origine étiologique différente pour chacun de ces deux groupes, à savoir environnementale pour les SHU- D⁺ et génétique pour les SHU-D⁻²¹⁸. Cette distinction sera confortée, en 1983, par la mise en évidence du rôle des Shiga-toxines dans le développement des SHU-D⁺²¹⁹.

Parallèlement, l'implication de la voie alterne du complément dans la physiopathologie des SHU atypiques a été progressivement suggérée par plusieurs constats:

- à partir de 1973, sont décrites, chez des patients souffrant de SHUa, des hypocomplémentémies C3 avec taux de C4 normal, la première description étant le fait de Cameron et al chez trois enfants et deux adultes avec un SHU sévère^{220,221} ;
- cette hypocomplémentémie C3 est associée à une augmentation des produits de clivage du C3 (C3c, C3d) et du FB (Ba, Bb) dans le sérum de patients souffrant d'un SHU, suggérant une activation de la voie alterne²²² ;
- Thompson et al rapportent en 1981 l'observation d'un garçon de 8 mois, né de parents consanguins, ayant développé un SHU dans un contexte de C3 bas et de déficit quantitatif en FH (<10% des valeurs normales). Les mêmes anomalies du complément étaient retrouvées chez son frère, cliniquement indemne²²³. De nombreuses publications suivront, tendant à suggérer un lien entre SHU et déficit quantitatif ou fonctionnel en FH^{224,225}.

De fait, le gène du FH a été le premier gène candidat à être étudié lorsqu'en 1998, Warwicker et al. ont pu établir un lien entre le SHUa et le locus RCA du chromosome 1q32. Cette équipe a ainsi identifié la première mutation du FH dans le SHU, une mutation hétérozygote localisée dans le SCR20 du FH, responsable d'une modification structurale de la protéine²²⁶.

Depuis, plusieurs groupes ont, non seulement, confirmé l'existence de mutations du FH dans le SHUa, mais également identifié des anomalies (mutations, auto-anticorps) intéressant d'autres protéines de la voie alterne du complément. Ceci a conforté l'hypothèse d'un lien fort entre dérégulation du complément et susceptibilité au SHUa. Ainsi, depuis 1998, des anomalies des protéines régulatrices - FH²²⁶, MCP²²⁷ et FI²²⁸ - ou activatrices - FB^{195,229} et C3²³⁰ - de la voie alterne du complément ont été successivement décrites et sont actuellement identifiées chez environ 60% des patients²¹⁶.

Plus récemment, des mutations intéressant deux autres protéines, n'appartenant pas au système du complément, ont été mises en évidence chez des patients souffrant de SHUa : d'une part, sur le gène de la thrombomoduline (THBD) en 2009²³¹ et d'autre part, sur le gène de la DGKE (diacylglycerol kinase ϵ) en 2013²³². Les liens physiopathologiques supposés entre la dysfonction de ces protéines et la survenue d'un SHU seront évoqués secondairement.

1.2 Epidémiologie et généralités cliniques

Le SHUa, qui représente 10 à 15% des SHU, est une pathologie rare dont l'incidence annuelle est estimée autour de 0,2 à 2 cas/millions d'habitants^{216,233}.

Les formes familiales, définies par l'existence d'au moins deux membres atteints au sein d'une même famille représentent moins de 20% des cas de SHUa²³⁴. Les deux modes de transmission autosomique récessif²³⁵ et dominant²³⁶ sont décrits, ce dernier étant néanmoins plus rare.

Les caractéristiques épidémiologiques et cliniques du SHUa ont été documentées par l'intermédiaire du registre international des SHU/PTT et de plusieurs cohortes nationales (Allemagne, Amérique du Nord, Espagne, France, Italie, Royaume-Uni), dont certaines ont fait l'objet de publications détaillées^{216,233,237-239}.

Le SHUa n'épargne aucune tranche d'âge, des cas ont été décrits tout aussi bien en période néonatale (dès le premier jour de vie) qu'à un âge adulte avancé (>80ans). Il est cependant plus fréquemment observé chez l'enfant avant l'âge de 2 ans et chez l'adulte entre 20 et 40 ans²¹⁶. Le sex-ratio semble présenter, de façon intéressante, une répartition différente entre les populations enfants et adultes. Ainsi, au sein de la cohorte française, il est d'environ 1 chez les enfants (n=89 ; sr : 42/47), tandis que chez l'adulte, il existe une prédominance féminine avec un sex-ratio à 3/1 (n=125 ; sr : 93/32)²¹⁶. Cette information n'est pas détaillée au sein des autres cohortes.

Cliniquement, l'absence de diarrhée ne doit plus constituer un critère discriminatoire entre SHUa et SHU secondaire aux Shiga-toxines. En effet, ce symptôme est initialement retrouvé

chez 17% (45/260) des patients du registre international et chez 25% (54/214) au sein de la cohorte française. Il est supposé secondaire soit à une infection digestive précipitant la poussée de SHU, soit à des lésions de MAT colique^{216,239}. De même, l'atteinte rénale n'est pas forcément exclusive. Des manifestations extra-rénales sont rapportées, sous la forme principalement d'évènements neurologiques (troubles de la vigilance, convulsions, déficits moteurs) dans environ 10% des cas^{216,239} et jusqu'à 48% dans une série de 23 enfants²⁴⁰ ou d'évènements cardiologiques (cardiomyopathie dilatée, défaillance cardiaque)^{241,242}. Ces derniers, bien que plus rares, ne sont pas exceptionnels (3 à 8% au sein du registre international)²³⁹ et peuvent s'intégrer dans un tableau de défaillance multi-viscérale, être secondaires aux complications de l'insuffisance rénale aiguë ou à des lésions de MAT²⁴³. Un monitoring du taux des troponines plasmatiques a d'ailleurs été proposé chez les patients présentant un SHU²⁴⁴. Notons par ailleurs que ces atteintes extra-rénales ne sont pas spécifiques des SHU associées à une anomalie de régulation du complément^{245,246}.

Le pronostic des SHUa est variable, notamment en fonction de l'anomalie de régulation du complément impliquée. Il est néanmoins souvent péjoratif avec un taux de mortalité rapporté autour de 10 à 15% et une évolution vers l'insuffisance rénale chronique terminale dans plus de la moitié des cas^{238,239,247}. Celle-ci peut s'observer dès la première poussée ou après un certain nombre de rechutes, lesquelles sont plus fréquentes dans la première année. Le taux de récurrence après transplantation rénale est, par ailleurs, de l'ordre de 50 %^{233,248}. L'optimisation de la prise en charge par plasmathérapie et le récent avènement du traitement par Eculizumab^{249,250} (AMM dans le SHUa depuis 2011), un anticorps monoclonal humanisé anti-C5 bloquant la voie terminale du complément, semble améliorer le pronostic fonctionnel rénal (reins natifs et transplantés)²⁰⁸ et des autres organes éventuellement atteints²⁵¹⁻²⁵³.

Une anomalie de régulation de la voie alterne du complément (mutation ou anticorps anti-FH) est identifiée chez environ 60% des patients. Ces anomalies peuvent porter sur les protéines régulatrices ou activatrices du complément avec des fréquences détaillées dans le tableau n°1.

Tableau n°1 : Fréquence des anomalies du complément identifiées chez les patients ayant présenté un SHUa^{216,233,239}

Cohorte Référence	USA Maga Hum Mut 2010	Internationale Noris JASN 2010	France Fremeaux Bacchi CIASN 2013
Période	nd	1996-2007	2000-2008
Nombre de patients	144	236*	214
Mutations (%)			
FH	23,6	25,4	27,5
FI	5,6	3,8	8,4
MCP	4,2	7,2	9,3
C3	2,1	4,7	8,4
FB	2,1	0,4	1,9
mutations combinées	5,6	3,8	4,2
THBM	1,4	5,1	0
Anticorps anti-FH (%)	nd	3,4	6,5

* Les SHU secondaires ont été exclus ; nd : non disponible

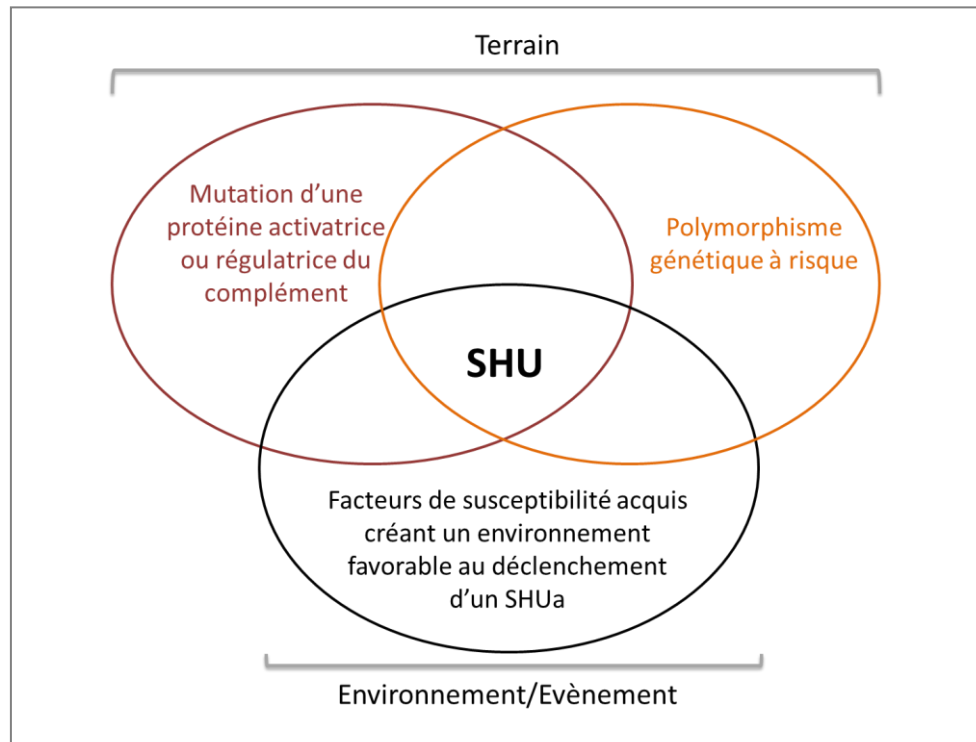
1.3 Physiopathologie du SHUa

Le SHUa est une pathologie multifactorielle, dont la pénétrance et l'expression sont variables. L'existence d'apparentés de patients porteurs de la même mutation mais restant asymptomatiques, les âges extrêmement variables auxquels peut survenir un SHUa, la mise en évidence fréquente de facteurs déclenchants ont amené à considérer les mutations des protéines du complément comme des facteurs de prédisposition au SHU plutôt que comme de stricts déterminants causals.

Comme toute pathologie multifactorielle, le SHUa résulte d'une conjonction de plusieurs éléments. Il faut un terrain et/ou un environnement qui crée la susceptibilité, plus ou moins forte à développer la pathologie et un évènement qui va provoquer, sur ce terrain/environnement, un dépassement des capacités de régulation de l'organisme et un

déséquilibre de la balance homéostatique en faveur d'un profil endothélial prothrombotique.

Figure n°12 : Le SHUa : une pathologie multifactorielle complexe



1.3.1 Le terrain : facteurs génétiques de susceptibilité au SHUa

1.3.1.1 Caractéristiques des mutations identifiées dans le SHUa

Les mutations de novo sont exceptionnelles et la plupart ont une pénétrance incomplète estimée généralement autour de 50%^{213,229-231}. Les mutations connues des FH, FI et MCP sont répertoriées dans une base de données interactive (www.FH-HUS.org), librement accessible, qui s'enrichit progressivement²⁵⁴. Y sont détaillés les caractéristiques des mutations (position, domaine, type) et rapportés brièvement le phénotype du patient (SHU, maladie à dépôts denses ou DMLA). Les conséquences fonctionnelles de ces mutations ne sont caractérisées que pour certaines d'entre elles.

En fonction de leurs conséquences quantitatives ou qualitatives, les mutations sont classées en deux groupes : i/ les mutations de type I, qui aboutissent à un défaut de sécrétion de la protéine. Ce déficit peut être secondaire à une absence de production (codon-stop prématuré) ou à des modifications structurelles de la protéine empêchant sa sécrétion à partir des compartiments intracellulaires. En cas de mutation homozygote, la protéine est donc indosable ; ii/ Les mutations de type II, qui sont responsables d'anomalies fonctionnelles de la protéine, sans induire de diminution de leur concentration plasmatique.

Mutations du FH et anomalies intéressants les CFHR

Les mutations du FH sont les anomalies de régulation du complément les plus fréquentes dans le SHUa, identifiées chez environ 25% des patients, ce qui souligne le rôle essentiel de cette protéine. Actuellement, 74 mutations du FH associées au SHUa sont rapportées dans la base de données (www.FH-HUS.org). Dans environ 11% des cas, elles sont de type I, hétérozygotes, le plus souvent responsables d'un décalage du cadre de lecture du gène, conduisant un à déficit partiel en FH^{254,255}. Le caractère partiel de ce déficit est important puisqu'en cas de déficit complet en FH, le phénotype clinique est plus généralement celui d'une maladie à dépôts denses (DDD) que d'un SHU, ce qui a également été observé dans des modèles murins²⁵⁶.

Parmi les mutations de type II, environ 60% intéressent la partie C-terminale du gène du FH, plus particulièrement les SCR 19-20, qui est donc décrite comme un « hot-spot » de mutations dans le SHUa^{257,258}. Ces mutations sont majoritairement responsable d'altérations de liaison entre la partie C-terminale de la protéine et ses ligands, en particulier le C3b et les GAG membranaires²⁵⁹⁻²⁶¹ et se traduisent par un défaut de contrôle du complément à la surface des cellules endothéliales^{262,263}.

L'existence de ce hot-spot a conduit à l'utilisation d'un test fonctionnel spécifique, décrit en 2004 par Sanchez-Corral, dans les premières étapes de caractérisation d'une mutation du FH de type II. Ce test est basé sur la capacité du FH à se lier aux érythrocytes de moutons et à s'opposer à leur hémolyse, due à une activation de la voie alterne du complément. La mesure de l'activité anti-hémolytique du FH présent dans le plasma de patients souffrant de SHUa permet ainsi d'apprécier les capacités du FH à se lier aux membranes cellulaires et à réguler la voie alterne^{264,265}.

Les homologies de séquence entre les gènes CFH et CFHR peuvent favoriser des recombinaisons homologues non alléliques, dont certaines ont été impliquées dans le SHUa :

- Délétion CFHR1-CFHR3 : Si la fréquence de cette délétion est significativement augmentée dans le SHUa (28% des patients versus 6 % des témoins)²⁶⁶, elle reste identique à celle des sujets témoins si les patients avec anticorps anti-FH sont exclus²⁶⁷. Ainsi, cette délétion semble plus impliquée dans l'auto-immunisation contre le FH que dans la pathologie elle-même. Cette délétion est retrouvée dans environ 2 à 30% de la population générale et n'apparaît donc, par ailleurs, pas suffisante pour induire la formation d'anticorps¹⁶⁵.
- Formation d'un gène hybride CFH/CFHR1. Deux types de protéines hybrides ont été décrites, constituées des 18 ou 19 premiers exons du CFH associés respectivement aux 2 derniers ou au dernier exon du CFHR1²⁶⁸. Les fonctions de reconnaissance des surfaces sont, par conséquent, altérées chez la protéine hybride.
- Formation d'un gène hybride CFH/CFHR3, rendant compte d'une protéine formée des SCRs 1-19 du FH et des SCRs 1-5 du CFHR3, dont les capacités de régulation à la surface des cellules, et non en phase fluide, serait altérée²⁶⁹.
- Formation d'un gène dit « hybride reverse », au sein duquel les exons 22 et 23 du FH sont associés au CFHR1²⁷⁰.

Des mutations intéressantes le gène du CFHR5 ont également été mises en évidence dans le SHUa^{271,272}.

Les SHUa associés à des mutations du FH sont généralement marqués par un mauvais pronostic rénal avec évolution fréquente vers l'insuffisance rénale chronique terminale. Ainsi, dans la cohorte française, cette évolution concerne environ 70% des patients à 5ans, dont 60% dès la première année suivant le SHU²¹⁶. Le risque de récurrence sur le greffon est également élevé, de l'ordre de 80%²⁷³.

Mutations de MCP

La présence de mutation de MCP dans le SHUa a été initialement décrite en 2003^{227,274}. Actuellement, 25 des 44 mutations de MCP décrites dans la base de données sont associées au SHUa (www.FH-HUS.org), parmi lesquelles environ 70% sont de type I et donc

responsable d'une diminution d'expression membranaire de la protéine. Elles sont le plus souvent hétérozygotes (réduction de 50% de l'expression), mais peuvent être homozygotes (expression < 10%). Dans le cas de certaines mutations de type II, une altération de l'activité cofacteur du FI pour le clivage du C3b, et non du C4b, a pu être mise en évidence^{227,274}.

Les SHUa associés à une mutation de MCP présentent plusieurs caractéristiques phénotypiques : ils semblent d'une part plus fréquemment survenir à un âge pédiatrique et d'autre part être marqué par des rechutes plus fréquentes²¹⁶. Par ailleurs, leur pronostic fonctionnel rénal est généralement plus favorable que dans le cas de mutations portées par les FH, FI, FB ou C3. La récurrence de SHU sur le greffon est notamment peu fréquente²³⁷, compte tenu probablement de l'apport par l'allogreffe d'une protéine membranaire fonctionnelle.

Mutations du FI

Plus de 30 mutations du FI sont actuellement associées au SHUa¹⁷⁰ et sont identifiées chez 2 et 10 % des patients. Elles sont en majorité hétérozygotes, de type I et responsable d'une diminution du taux de protéines circulantes ou plus rarement de type II associée à une augmentation de la demi-vie du C3b^{228,275,276}.

Le pronostic fonctionnel rénal des patients porteurs d'une mutation du FI est souvent défavorable, une insuffisance rénale chronique terminale étant rapportée dès la première année dans environ 50% des cas²¹⁶. Cette évolution est cependant variable et semble fortement influencée, comme nous le verrons secondairement, par l'existence concomitante d'autres anomalies génétiques. Enfin, une association plus fréquente à des épisodes infectieux a été décrite²³⁸, possible conséquence de la diminution de production d'opsonines par le FI muté.

Mutations du FB

Les mutations du FB, décrites initialement en 2007, sont rares, identifiées chez 0,5 à 2% des patients²²⁹. Il s'agit de mutations « gain de fonction », responsable par augmentation de l'affinité du FB avec le C3b, de la formation d'une « hyper C3 convertase alterne » plus efficace et dont la demi-vie est plus longue^{195,229}. Le nombre peu élevé de patients rend le

pronostic rénal difficile à évaluer, néanmoins il est généralement rapporté comme étant péjoratif.

Mutations de la protéine C3

Les mutations du gène du C3 concernent actuellement 2 à 8,5 % des patients présentant un SHUa. La première description de cette association a été réalisée en 2008, où 9 mutations du C3 ont été identifiées chez 14 patients. L'étude de leurs conséquences fonctionnelles a montré une diminution significative de la liaison du C3 muté avec la MCP pour 5 de ces mutations, ainsi qu'avec le facteur H pour trois d'entre elles. Il en résultait donc un gain de fonction indirect, secondaire à une diminution des activités cofacteurs de MCP et/ou du FH, responsable d'une résistance acquise au clivage par le FI²³⁰. Depuis, trois autres mutations du C3 ont été décrites²⁷⁷⁻²⁷⁹, parmi lesquelles la mutation C3_{R139W}. Celle-ci présente l'intérêt d'avoir été mise en évidence de façon sporadique chez 14 patients. La caractérisation phénotypique des SHU de ces 14 patients ainsi que l'étude fonctionnelle de cette mutation et de ses conséquences pour l'endothélium ont constitué une partie de mon travail de thèse (p.111).

Les mutations du C3, tout comme les mutations du FB, s'associent plus souvent à une diminution du C3 circulant, traduction probable d'une consommation par une C3 convertase rendue plus efficace par la protéine mutée. Le pronostic des SHU associés à une mutation du C3 est variable mais, là aussi, souvent péjoratif. L'évolution vers l'insuffisance rénale chronique terminale est rapportée, au sein de la cohorte française adulte de SHUa, dans environ 70% des cas dont 60% dans la première année²¹⁶.

Autres mutations

L'absence de facteur de susceptibilité génétique chez 30 à 40% des patients avec un SHUa a motivé la recherche de nouveaux gènes candidats. Il a ainsi été récemment mis en évidence dans le SHUa, des mutations intéressant deux gènes codant pour des protéines n'appartenant pas au système du complément, la thrombomoduline (THBD) et la DGKE.

En 2009, Delvaeye et al ont identifié six mutations du gène de la THBD chez sept patients ayant présenté un ou plusieurs épisodes de SHU²³¹. Actuellement, une anomalie intéressant ce gène est retrouvée chez 0 à 5% des patients, selon les cohortes (cf. tableau

n°1, p. 53). Les caractéristiques de cette protéine de la coagulation aux propriétés de régulateur négatif de la cascade complémentaire seront décrites secondairement (p.92). Cette découverte a souligné les interactions entre les systèmes du complément et de la coagulation.

Par ailleurs, récemment, Lemaire et al ont mis en évidence, chez des patients avec un SHUa, sans autres facteurs de susceptibilité génétique, une mutation homozygote ou hétérozygote composite du gène de la DGKE²³². Les patients présentaient tous un SHUa avant l'âge de un an, dont l'évolution était marquée par la persistance fréquente d'anomalies urinaires (protéinurie, hématurie) et l'installation secondaire d'une insuffisance rénale chronique. La DGKE est une protéine membranaire, exprimée notamment dans le rein, par les podocytes glomérulaires et les cellules endothéliales, ainsi que par les plaquettes. Il s'agit d'une kinase catalysant la phosphorylation en acide phosphatidique de substrats diacyl-glycérol, eux-mêmes impliqués dans l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PKC s'accompagne de l'augmentation de la synthèse de médiateurs prothrombotiques (FvW, FT, inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I). Ainsi, un déficit fonctionnel de la DGKE est susceptible d'induire un phénotype endothélial prothrombotique en altérant l'inhibition de la PKC. Pour l'heure, aucun lien avec le complément n'a été établi et cette découverte suggère que le SHUa ne constitue pas une pathologie restreinte uniquement aux conséquences de l'activation incontrôlée du complément, mais puisse être secondaire à d'autres mécanismes dont les conséquences sur la cellule endothéliale sont identiques.

1.3.1.2 Caractère multigénique des SHUa

Place des polymorphismes

Les polymorphismes sont des variations de séquence dans le génome humain dont la fréquence dépasse 1%. Ils participent à la diversité phénotypique des populations ou individus, à la différence de sensibilité à une pathologie ou de réponse à un médicament. Ce sont en grande majorité des changements d'une seule base, nommés single nucleotide polymorphism (SNP), qui sont stables et distribués uniformément dans tout le génome. Ces

variations nucléotidiques peuvent induire un changement d'acides aminés et donc d'éventuelles modifications structurales de la protéine, responsables d'un gain ou d'une perte partielle de fonction.

Les pénétrances et expressions variables du SHU ont conduit à suggérer une participation multigénique et à rechercher des polymorphismes dans les gènes de susceptibilité de cette pathologie. Actuellement, des polymorphismes sont rapportés dans le SHUa au sein des gènes du FH^{280,281}, du CFHR1²⁶⁷, de la MCP²⁸⁰ et de la C4BP²⁸². Deux haplotypes sont tout particulièrement mis en cause : d'une part, l'haplotype CFH_{gtgt}, défini par 4 SNPs situés sur les SCRs 1,7, 11 et 16 du FH et d'autre part, l'haplotype MCP_{gggac}, défini par 5 SNPs localisés dans l'intron et la zone promotrice du gène de MCP²⁸⁰, dont les fréquences sont toutes deux augmentées dans la population de patients par rapport à la population témoin.

L'amélioration des connaissances des différents polymorphismes portés par les protéines du complément et la mise en évidence d'effets protecteurs ou délétères de ces derniers dans diverses pathologies - DMLA, DDD, maladie d'Alzheimer, athérosclérose - a conduit à définir ce répertoire de polymorphismes comme un complotype²⁸³. En fonction de sa composition, un individu donné aurait donc un équilibre homéostatique du complément plus ou moins favorable à son activation. Ainsi, un complotype proactif constituerait un facteur protecteur vis-à-vis des processus infectieux mais à l'inverse un facteur de susceptibilité aux pathologies inflammatoires. De fait, l'analyse du complotype d'un patient, en conjonction avec celle des autres facteurs de risque, génétiques ou environnementaux, pourrait, selon les auteurs, permettre de prédire la pénétrance et l'évolution d'une pathologie telle que le SHUa^{9,283}.

Influence phénotypique des mutations combinées et des polymorphismes

La pénétrance et la sévérité du SHUa sont influencées par le nombre de mutations et/ou l'existence concomitante de polymorphismes à risque chez les patients. Dans un récent travail, Bresin et al rapportent, parmi 795 patients répertoriés, la présence de mutations combinées chez 27 d'entre eux (3,4%)²⁸⁴. Seuls 8 à 10% des patients porteurs d'une mutation du FH, FB ou C3 avaient une autre mutation, suggérant que l'altération d'une de ces trois protéines constitue, en soi, un facteur de risque fort à développer un SHUa. A l'inverse, 25% des patients avec une mutation de MCP ou du FI, présentaient une ou deux

autres mutations. Ceci est concordant avec la plus grande variabilité phénotype observée dans les SHUa associés à une mutation de l'une de ces deux protéines, où l'évolution apparaît en effet plus sévère lorsqu'une autre anomalie se surajoute. Ainsi, concernant les mutations du FI, un devenir fonctionnel plus défavorable des reins natifs ou du greffon, a été rapporté en cas d'existence concomitante d'une délétion du CFHR1^{273,276}. De même, le pronostic rénal des SHUa associés à une mutation de MCP est assombri par l'addition d'une autre anomalie, marqué par une plus haute incidence d'insuffisance rénale chronique terminale et un risque de récurrence sur le greffon²⁸⁴.

Bresin et al objectivent, par ailleurs, une pénétrance de la maladie assez faible lorsqu'il n'existe qu'une mutation, de l'ordre en moyenne de 10%, ce qui suggère une participation alors forte des facteurs environnementaux. Cette pénétrance augmente à 55% chez les patients avec deux mutations pour devenir complète lorsque 3 mutations coexistent (2/2 patients). L'existence de polymorphismes à risque, particulièrement des haplotypes MCP_{ggaac} et FH_{gtgt} décrits précédemment, augmente également la pénétrance du SHUa^{237,267,280,284} et module sa sévérité²⁸⁵.

1.3.2 Environnement/Évènement : facteurs acquis de susceptibilité au SHUa

1.3.2.1 Présence d'anticorps dirigé contre des protéines du complément

Auto-anticorps anti-FH

Décrite initialement en 2005²⁸⁶, la présence d'auto-anticorps anti-FH est actuellement rapportée dans 3 à 7% des SHUa et jusqu'à 11% dans la cohorte allemande²⁸⁷. Ces anticorps sont responsables d'un déficit fonctionnel acquis en FH via différents mécanismes. Il a été rapporté, en particulier, que ces anticorps liaient majoritairement la partie C-terminale du FH, données concordantes avec le « hot-spot » de mutations dans les SCRs 19 et 20 observé dans le SHUa²⁸⁸. Ils peuvent ainsi inhiber la liaison du FH au C3b, au C3d et/ou à l'héparine, altérant ainsi les capacités du FH à lier et donc à protéger les surfaces endothéliales^{288,289}. Plus récemment, il a également été montré que certains de

ces anticorps pouvaient se fixer sur les SCR1-4 du FH et s'associer à une altération de ses fonctions de cofacteur du FI²⁸⁹. Enfin, certains anticorps agiraient en inhibant la liaison du FH à la pentraxine 3²⁹⁰, glycoprotéine notamment exprimée à la surface des cellules endothéliales et impliquée dans l'activation du complément par la voie classique mais également dans la régulation de la voie alterne via ses capacités de liaison et de recrutement du FH¹⁵⁵. Dans environ 90% des cas, les patients porteurs d'anticorps anti-FH, présentent de façon concomitante une délétion homozygote des CFHR1 et CFHR3^{287,291}.

Les SHUa associés aux anticorps anti-FH surviennent majoritairement à un âge pédiatrique mais peuvent également être observés chez les adultes, qui représentent environ 15% des cas. Les rechutes et l'existence d'un taux bas de C3 constituent des facteurs de mauvais pronostic fonctionnel rénal²⁹¹. Enfin, leur prise en charge diffère. Elle repose d'une part, sur les traitements immunosupresseurs et d'autre part, sur les échanges plasmatiques avec une réponse généralement meilleure qu'en cas de SHU associé à une mutation, ce qui s'explique compte tenu du mécanisme physiopathologique en cause.

Autres anticorps

Récemment, Kavanagh et al ont mis en évidence la présence d'autoanticorps anti-FI chez 2% des patients de la cohorte anglaise de SHUa (3/175). Les auteurs n'excluent pas qu'il s'agisse d'un épiphénomène, compte tenu d'une part que deux des patients étaient également porteur d'une mutation du FH et de polymorphismes à risque sur le gène du FH et/ou de MCP et d'autre part que la cinétique du titre d'anticorps ne semblait pas corrélérer à l'évolution de la pathologie. Ils suggèrent, cependant, que ces anticorps anti-FI puissent constituer un facteur de susceptibilité supplémentaire au SHUa ou qu'ils soient l'expression d'une dysrégulation chronique du complément, pouvant favoriser le développement d'anticorps dirigés contre les composants du complément. Notons qu'aucun des patients ne présentait de délétion CFHR1-CFHR3²⁹².

Par ailleurs, la présence d'auto-anticorps anti-FB²⁹³ et anti-C3b²⁹⁴ n'est, pour l'heure, rapportée que chez quelques patients présentant une DDD, avec un effet montré, pour l'anti-FB, de stabilisation de la C3 convertase à la manière d'un facteur néphritique (C3Nef).

1.3.2.2 Environnement/Événement associé à la survenue d'un SHUa

Dans les descriptions de cohorte de SHUa les plus récentes, un facteur environnemental, désigné comme déclenchant, est décrit chez environ 50% des patients^{216,239}. Les évènements les plus fréquemment rapportés sont des épisodes infectieux, d'allure non spécifique. Caprioli et al., notamment, en décrivent chez 100, 70 et 60 % des patients porteurs respectivement d'une mutation dans les gènes du MCP, FH et FI²³⁷. La période puerpérale, divers médicaments ou drogues, les procédures de transplantation ont également été mises en cause. Concernant ce dernier point, des anomalies génétiques du complément ont d'ailleurs été identifiées chez près de 30% des patients, au sein d'une série de 24 sujets présentant une MAT de novo post-transplantation rénale²⁹⁵.

Ces facteurs déclenchants sont donc de nature diverse et agissent probablement en développant un environnement microvasculaire prothrombotique, qui en cas d'anomalie sous-jacente de la régulation du complément, peut d'autant plus favoriser l'apparition de lésions de MAT. Les mécanismes, par lesquels interviennent ces différents facteurs sont encore mal identifiés et probablement multiples : agression endothéliale directe ; stimulation de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires susceptible d'induire une activation endothéliale, leucocytaire ou plaquettaire ; développement d'auto-anticorps dirigés contre l'ADAMTS-13, contre les cellules endothéliales ou contre d'autres acteurs cellulaires des MAT, tels que les plaquettes ou les neutrophiles ; déséquilibre de la balance de l'hémostase, en stimulant la production d'agents prothrombotiques et/ou en inhibant celle d'agents anti-thrombotiques ; augmentation des forces de cisaillement, qui potentialise notamment l'action du FvW ; induction d'une activation du complément.

A titre d'exemple, la grossesse et le post-partum semblent, tout particulièrement, créer un environnement à haut risque de MAT. Ils constituent, après les épisodes infectieux, les principaux facteurs environnementaux identifiés dans le SHU. Ainsi, au sein de la cohorte française de SHUa, environ 20% des patientes déclenchent un SHU à l'occasion d'une grossesse et ce, plus généralement, dans le post-partum (80% des cas)²⁹⁶. Parmi les 21 patientes de la cohorte française, 18 étaient porteuses d'une ou plusieurs anomalies génétiques intéressant les FH, FI, MCP ou C3, suggérant une plus forte nécessité, en période peri-partum, d'avoir un complément correctement régulé.

Plusieurs éléments concourent, lors d'une grossesse même normale, pour créer cet environnement à risque. En premier lieu, une activation du complément est décrite durant la grossesse normale. Derzsy et al rapporte, en effet, une augmentation des taux plasmatiques de C3a (multipliés par 8,8) et de C5b-9 soluble (multipliés par 1,8)²⁹⁷. Par ailleurs, des dépôts de C3b et C4b ont été observés à la face maternelle du placenta, désignant ce dernier comme un probable site d'activation du complément chez les parturientes²⁹⁸. Ceci pourrait expliquer que les trophoblastes soient richement pourvus en protéine de régulation du complément. En effet, ces cellules expriment particulièrement DAF, ainsi que d'autres protéines de régulation membranaire (MCP, CD59)²⁹⁸ et elles synthétisent également du FH²⁹⁹, dont les taux ont été décrits augmentés d'environ 30% au cours de la grossesse normale²⁹⁷. La susceptibilité apparemment plus importante du post-partum à la survenue d'un SHU complément-dépendant n'est, pour l'heure, pas expliquée. Il a été suggéré un rôle compensateur des facteurs de régulation du complément d'origine fœtale, disparaissant avec la délivrance.

Outre l'activation du complément, d'autres éléments rapportés au cours de la grossesse normale sont susceptibles de créer un environnement prothrombotique : une élévation des taux plasmatiques de FvW associée à une diminution de l'activité de l'ADAMTS-13³⁰⁰ ; une augmentation de la capacité à générer de la thrombine, en particulier au troisième trimestre de la grossesse³⁰¹ ; une endothéliose glomérulaire³⁰².

Ainsi, la grossesse - mais d'autres facteurs environnementaux auraient pu être détaillés - induit, par l'intermédiaire de différents mécanismes, une susceptibilité endothéliale prothrombotique, capable d'évoluer vers un tableau de MAT si se surajoute, par exemple, une anomalie de régulation du complément. Pour autant, dans de nombreux cas, les patientes ont un ou plusieurs antécédents de grossesse normale avant la survenue du SHU (13/18 patientes dans la cohorte française de SHUa)²⁹⁶, traduisant bien là la complexité de la pathologie et la nécessité d'intervention de multiples facteurs.

Nous verrons, dans la partie suivante, que bien qu'ayant un agent initiateur différent, les autres formes étiologiques de SHU conservent ce caractère multifactoriel et partagent plusieurs mécanismes physiopathologiques, parmi lesquels le complément, notamment, trouve une place.

2. Autres facteurs étiologiques du SHU et place du complément

2.1 Les Shiga-toxines

2.1.1 *Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des SHU-Stx*

Environ 90% des SHU sont rapportés être secondaires à une infection à *Escherichia Coli* (*E. coli*) producteur de Shiga-toxines (Stx)³⁰³, faisant de cette toxine bactérienne le principal agent étiologique de SHU.

L'incidence annuelle des SHU secondaires aux Shiga toxines (SHU-Stx), variable selon les pays, est estimée autour de $2,1/10^5$ ³⁰⁴. En France, cette incidence, surveillée par l'institut de veille sanitaire, a été évaluée pour la période 1996-2007 entre 0,59 et $1,01/10^5$ enfants de moins de 15 ans (<http://www.invs.sante.fr>).

Les SHU-Stx font suite à une infection intestinale par des bactéries productrices de Shiga-toxines, principalement *E. coli* O157:H7, sérotype mis en cause dans 70 % des cas dans les pays occidentaux³⁰⁵. D'autres sérotypes d'*E. Coli* (O111:H8, O103:H2, O121, O26, O145, O113) et d'autres germes, tel que *Shigella dysenteriae*, ont été isolés de façon plus anecdotique³⁰³. Le réservoir principal de ces germes étant les ruminants, la transmission humaine est généralement oro-fécale, via l'ingestion de produits carnés, de produits laitiers non pasteurisés ou de fruits ou légumes crus contaminés. Ces infections surviennent, le plus souvent, sous forme de petites épidémies saisonnières, leurs expressions cliniques variant de la simple gastro-entérite aigüe à la colite hémorragique et au SHU, qui se développent 5 à 13 jours après les prodromes diarrhéiques chez 5 à 15% des patients infectés³⁰⁶. Classiquement, le SHU-Stx survient sous forme d'épisode unique, chez des enfants entre 1 et 15 ans. Il est généralement dit de bon pronostic, néanmoins un recours à l'épuration extra-rénale est nécessaire dans 30 à 40% des cas et le taux de mortalité en phase aiguë est compris entre 1 et 5 %³⁰⁷. La persistance de séquelles rénales est, par ailleurs, rapportée chez 25 à 30% des patients, sous la forme d'insuffisance rénale chronique, de protéinurie ou d'hypertension artérielle. Ces séquelles sont d'autant plus fréquentes que le recours initial à l'épuration extra-rénale a été prolongé^{308,309}.

La récente épidémie d'infections à STEC (Shiga-toxin-Producing *E. coli*), survenue durant l'été 2011 dans le nord de l'Allemagne, est venue malmenager cette vision très uniciste du SHU « typique ». En premier lieu, cette épidémie, en concernant 8316 patients dont 845 ont développé un SHU (22%), a surpris par son ampleur. D'autres atypies ont été relevées, notamment dans la répartition démographique : d'une part, 88% des patients étaient des adultes et seulement 2% avaient moins de 5 ans contre 69% sur la période 2001-2010 en Allemagne; d'autre part, alors que d'ordinaire le sex-ratio est autour de 1, il a été constaté une prédominance féminine (68%)³¹⁰, rappelant ici ce qui est déjà observé pour les SHU associés à une anomalie du complément, à savoir qu'à l'âge adulte, les femmes semblent avoir une plus grande susceptibilité au SHU²¹⁶. Enfin, outre une atteinte rénale sévère nécessitant un recours à l'épuration extra-rénale dans 50% des cas, la présentation clinique a été marquée par une fréquence particulièrement importante d'évènements neurologiques, rapportés chez 48% des patients contre 20 à 25% dans les séries habituelles de SHU-Stx^{311,312}.

Ces atypies ont été principalement rapportées à la virulence de l'agent pathogène, que les enquêtes épidémiologiques et microbiologiques ont identifié comme étant un *E.coli* O104:H4. Cette souche présente, en effet, la particularité d'être un *E.coli* enteroaggrégatif ayant acquis le gène Stx2, combinant ainsi plusieurs facteurs de virulence³¹³.

2.1.2 Mécanismes physiopathologiques des Shiga-toxines

Description des agents pathogènes

Le groupe des STEC est formé de certaines souches d'*E. Coli* entérohémorragique et, pour l'heure, d'une souche d'*E. Coli* enteroaggrégatif (souche O104:H4). Elles se distinguent par leur capacité à produire des cytotoxines capable d'inhiber in vitro la multiplication des cellules Vero (cellule rénale du singe vert d'Afrique), d'où l'appellation verotoxines ou verocytotoxines parfois utilisée³¹⁴. Ces cytotoxines ont été regroupées sous le terme de Shiga-toxines, compte tenu de leurs homologues avec la toxine de *Shigella dysenteriae* de type 1³¹⁵ et identifiées comme un facteur étiologique de SHU en 1983 par Karmali²¹⁹.

Actuellement, deux grandes classes de Shiga-toxine sont distinguées, les Stx1 et les Stx2. Si leur mécanisme d'action est similaire, elles se distinguent par certaines de leurs propriétés immunologiques ou biochimiques, rendant compte de différences d'activité biologique ou de spécificité de liaison à leurs récepteurs, ce qui est susceptible de modifier leur virulence. Ainsi, la cytotoxicité de Stx2 pour les cellules endothéliales rénale humaines est 1000 fois supérieure à celle de Stx1³¹⁶. Ces résultats corroborent les données épidémiologiques selon lesquelles les souches d'*E. Coli* responsables des SHU les plus sévères produisent Stx2³¹⁷.

Mécanismes lésionnels des Shiga-toxines

L'étude des mécanismes physiopathologiques des Shiga-toxines a fait l'objet de nombreux travaux, qui ont permis d'identifier les différentes étapes nécessaires à l'expression de leur virulence endothéliale directe (figure n°13, p.68).

Plus récemment, il est apparu que les Stx induisaient également, à concentrations subléthales, d'autres effets proinflammatoires et prothrombotiques, susceptibles de contribuer au développement des lésions de MAT, parmi lesquels :

- Une augmentation de l'expression, par les cellules endothéliales, de certaines chemokines (IL8, MCP-1, SDF-1), récepteurs de chemokines (CXCR4, CXCR7)³²⁷ et molécules d'adhérence (VCAM, ICAM, PECAM-1, P-selectine)³²⁸, qui participent ensuite au recrutement leucocytaire et plaquettaire ;
- Une dégranulation des neutrophiles et une activation des macrophages et monocytes, conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-6)³²⁹;
- Une diminution de l'expression par les cellules endothéliales du facteur anti-apoptotique Mcl-1³³⁰;
- Une augmentation de l'expression et de l'activité du facteur tissulaire sur les cellules endothéliales (cellules endothéliales glomérulaires, HUVECs)³³¹ ;
- Une activation plaquettaire, à l'origine notamment, d'une exocytose de FvW et de P-sélectine³³² ;
- Une inhibition de l'activité ADAMTS-13³³³.

Figure n°13 : Cytotoxicité endothéliale directe des Shiga-toxines (adaptée de Noris, JASN, 2005)³⁰⁴

1/ Liaison des Stx aux enterocytes via une intimine, protéine d'adhérence sécrétée par *E. coli*³¹⁸ ; 2/ Les Stx traversent l'épithélium intestinal par voie notamment para-cellulaire³¹⁹ ; 3/ Les Stx circulent jusqu'aux organes cibles, liées à des cellules circulantes hématopoiétiques (neutrophiles, en particulier³²⁰ ; erythrocytes et plaquettes seraient également impliqués^{321,322}), dont les récepteurs seraient moins affins que celui des cellules-cibles, leur permettant de se libérer de leurs transporteurs une fois atteint l'environnement des cellules-cibles³²³ ; 4/ Liaison des Stx, par leur sous-unités B, à leurs cellules-cibles via un récepteur membranaire glycolipidique spécifique, le récepteur globotriaosylcéramide Gb3³²⁴. Ce récepteur est abondamment exprimé dans le rein, au niveau des cellules endothéliales glomérulaires et du tube contourné proximal, ainsi que sur l'endothélium microvasculaire colique³²⁵ et cérébral ; 5/ La sous unité A est internalisée par endocytose puis transportée par voie rétrograde jusqu'au réticulum endoplasmique, où elle est scindée en deux parties A1 et A2 par réduction d'un pont disulfure ; 6/ la partie A1 exerce alors son activité N-glycosidase sur l'ARN ribosomique 28S et bloque la sous-unité 60S du ribosome³²⁶, conduisant à un arrêt de la synthèse protéique et à la mort cellulaire.

2.1.3 Place du complément

Plusieurs équipes ont rapporté une activation de la voie alterne du complément chez des enfants présentant un SHU-Stx, suggérant une participation de ce système dans la

constitution des lésions. Une augmentation du C5b-9 soluble et des produits de clivage du C3 et du FB a, en effet, été constatée en phase aiguë dans le plasma de ces enfants³³⁴⁻³³⁶.

In vitro, plusieurs travaux ont montré que les Stx agissaient non seulement en induisant une activation directe du complément mais également en altérant les fonctions de certaines de ses protéines régulatrices.

Orth and al, en 2009, ont observé, en ELISA, une augmentation de la concentration du complexe terminal du complément, dépendante de la voie alterne, lorsque sérum et Stx2 étaient co-incubés. Ils suggéraient ainsi une activation du complément par les Stx en phase fluide³³⁷. Sous l'effet de ce stimulus, une augmentation du dépôt de C3 à la surface de cellules endothéliales a également été décrite par Morigi et al³³⁸, qui ont montré dans ces mêmes conditions une augmentation de l'expression de P-selectine, capable d'activer la voie alterne⁹⁴.

D'autre part, il a été rapporté que la Stx2 pouvait lier le FH (SCRs 6-8 et 18-20). Cette liaison pourrait altérer ses activités de cofacteur à la surface des cellules, sans modifier ses propriétés de régulation en phase fluide³³⁷. Une diminution de l'expression de thrombomoduline a également été observée après exposition de cellules endothéliales aux Stx1³³⁸ et Stx2³³⁹.

Certaines de ces observations ont été confirmées, in vivo, dans un modèle murin de SHU induit par co-injection de Stx2 et de LPS. En effet, une augmentation du dépôt de C3, de l'expression de P-selectine et une diminution de l'expression membranaire de thrombomoduline ont été observées sur les glomérules de ces souris³³⁸. Dans les mêmes conditions d'activation, l'inhibition de la voie alterne du complément (souris déficientes en FB) s'est accompagnée d'une réduction des dépôts glomérulaires de fibrine et des thrombi intra-capillaires. Les répercussions fonctionnelles rénales étaient également moins marquées. Les auteurs ont mis en évidence un rôle fort du C3a dans la genèse des lésions de MAT de leur modèle, en montrant notamment une diminution des dépôts glomérulaires de fibrine en cas de blocage du C3aR par un antagoniste. Ces résultats suggèrent une place probablement importante de la voie alterne du complément dans la constitution des lésions rénales de MAT dans le SHU-Stx.

La récente utilisation, avec succès, de l'Eculizumab chez trois jeunes patients souffrant d'un SHU-Stx particulièrement sévère, tend à conforter cette hypothèse³⁴⁰. Cependant, ces résultats prometteurs n'ont pas été systématiquement confirmés^{341,342}. Menne et al, dans une étude comparant rétrospectivement l'évolution de patients ayant reçu ou non de l'Eculizumab, n'ont pas montré de bénéfice clinique ou biologique significatif de ce traitement³⁴².

2.2 Désialylation par des neuraminidases : SHU associé au pneumocoque

2.2.1 Acides sialiques et neuraminidases : généralités

Les acides sialiques sont des monosaccharides, retrouvés communément à l'extrémité terminale des glycoconjugués (glycoprotéines, glycolipides, oligosaccharides) de la surface des cellules eucaryotes et des polysaccharides capsulaires d'un certain nombre d'agents pathogènes. Ils sont abondants, ubiquitaires et constituent, à la surface des eucaryotes, un élément essentiel du glycocalyx, auquel il confère une partie importante de ses propriétés biophysiques (charge négative ; hydrophilicité). Les fonctions des acides sialiques, encore imparfaitement connues, sont multiples, notamment dans le domaine des interactions cellulaires et de l'immunité³⁴³. Concernant ce dernier point, ils participent, en effet, à la régulation de la voie alterne du complément : Fearon et al. ont rapporté en 1978 que, sous l'effet d'une désialylation, des érythrocytes de mouton, qui n'activent physiologiquement pas le complément, devenaient alors des surfaces activatrices. Les mêmes observations ont été rapportées par Pangburn et al. après traitement des érythrocytes par de la neuraminidase^{344,345}. Cet effet protecteur des acides sialiques contre une activation du complément sur les cellules autologues est principalement porté par le FH, capable de lier, comme nous l'avons vu, les surfaces polyanioniques, riches en acides sialiques et/ou en GAG (héparane sulfate) par ses domaines SCR 7 et 20^{153,346}. Le FH peut ainsi reconnaître les surfaces non-activatrices des cellules hôtes, riches en polyanions, et jouer un rôle central dans la discrimination des surfaces du soi et du non-soi. Il a été montré une relation linéaire entre la diminution des acides sialiques membranaires et la capacité du FH à

dissocier la C3 convertase alterne, traduisant une altération de la fonction de ce régulateur sous l'effet d'une désialylation des membranes. D'autre part, il est également établi que l'affinité entre le FH et le C3b est modulée par un environnement polyanionique, dont la proximité avec le FH semble augmenter son avidité pour le C3b^{146,147}, rôle particulièrement important à la surface des cellules endothéliales^{347,348}.

Les neuraminidases constituent une large famille d'enzymes glycosylées capables de cliver, par hydrolyse, les acides sialiques. Elles sont présentes chez de nombreuses espèces notamment virales ou bactériennes, chez qui elles peuvent constituer un facteur de virulence. Certains tableaux de SHU sont associés à des infections à germes producteurs de neuraminidases, suggérant un rôle de la désialylation dans la physiopathologie de ce syndrome³⁴⁹.

2.2.2 SHU associés à des germes producteurs de neuraminidase

SHU associés à *Streptococcus Pneumoniae* (SHU-SP)

L'association entre infection à *S. pneumoniae* et SHU a été initialement rapportée en 1971³⁵⁰. Dans les séries les plus récentes, ce germe est mis en cause dans 7 à 14% des SHU de l'enfant^{351,352} et son incidence dans les suites d'une infection invasive à *S. pneumoniae* de l'enfant est estimée entre 0,4 et 0,6%^{353,354}. L'apparition des symptômes imputables au pneumocoque, le plus souvent pulmonaire (pneumopathie ou empyème) dans 65 à 92% des cas ou neurologique (méningite), précède de 3 à 13 jours le développement du SHU³⁵⁵. Les particularités phénotypiques de ce SHU, outre de survenir principalement chez des enfants de moins de trois ans^{356,357} et d'être classiquement exempt de syndrome diarrhéique, concernent sa sévérité. En effet, le taux de mortalité est élevé (entre 2 et 12%), en particulier dans les formes associées à une méningite et l'atteinte rénale est marquée : le recours initial à la dialyse est nécessaire dans plus de 70% des cas, 10 à 16% des enfants évoluent vers l'insuffisance rénale chronique terminale et environ 15 à 37% conservent une insuffisance rénale chronique séquellaire^{352,356,357}.

La physiopathologie du SHU-SP reste imparfaitement comprise mais l'hypothèse la plus largement admise implique les neuraminidases produites par le *S. pneumoniae*. Celles-ci, en désialylant des glycoprotéines membranaires, induisent l'exposition d'un antigène normalement cryptique, l'antigène Thomsen-Friedenreich (antigène T). Ce disaccharide (Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/thr) est une des structures de base des O-glycannes et un constituant fréquent des mucines. Il est exprimé à la surface des érythrocytes, plaquettes, hépatocytes et cellules rénales (cellules endothéliales des capillaires glomérulaires et cellules épithéliales tubulaires)³⁵⁸, où il est protégé à son extrémité terminale par un acide sialique. Lorsqu'il est exposé, il peut alors être reconnu par des anticorps IgM anti-T et cette interaction conduirait au développement d'un SHU en favorisant une poly-agglutination des érythrocytes, une hémolyse et des lésions endothéliales rénales directes^{359,360}.

Autres SHU impliquant des neuraminidases

La description de SHU associés à d'autres germes producteurs de neuraminidases, renforce l'hypothèse d'un rôle fort de la désialylation dans la physiopathologie de cette pathologie. Des SHU concomittants d'une infection grippale, ont initialement été rapportés chez des patients transplantés rénaux³⁶¹ qui présentaient de fait d'autres facteurs de susceptibilité de MAT. Au décours de la pandémie d'infection à Influenza A (H1N1) en 2009, d'autres cas ont été décrits chez des sujets non transplantés. Trois formes de SHU ont ainsi été distinguées : i) SHU-Sp se développant dans les suites de l'infection grippale ; il a en effet été montré que les infections à Influenza favorisaient les surinfections pulmonaires à *S. pneumoniae* ; ii) SHU déclenché par la grippe chez des patients porteurs d'une anomalie de régulation du complément ; iii) SHU déclenché par la grippe en l'absence de facteur étiologique sous-jacent identifié³⁶².

D'autre part, de façon plus anecdotique, des cas de SHU ou de purpura thrombotique thrombocytopénique ont été décrits lors d'infections à *Capnocytophaga canimorsus*^{363,364,365}.

2.2.3 Place du complément

L'exposition de l'antigène T est insuffisante pour expliquer à elle seule la survenue d'un SHU³⁶⁶. Certains travaux ont, d'ailleurs, montré une diminution de la survie des érythrocytes après traitement par de la neuraminidase et ce, indépendamment du titre d'antigènes T³⁶⁷. De fait, d'autres hypothèses physiopathologiques émergent, impliquant en particulier le FH. D'une part, comme nous l'avons vu, la désialylation réduit ses capacités à lier et protéger les cellules hôtes. D'autre part, certains sérotypes de pneumocoque pourraient recruter le FH via certaines protéines de surface, telles que les CbpA (choline-binding protéin A) aussi désignées comme les PspC (pneumococcal surface protein C)^{368,369}. Récemment, une équipe hongroise a étudié les composants du complément chez les enfants présentant un SHU-SP. Les cinq patients inclus présentaient une diminution des fractions C3 et C4 du complément et trois d'entre eux étaient porteurs d'une mutation sur le gène d'une des protéines régulatrices de ce système³⁷⁰.

Ainsi, l'altération du glycocalyx s'avère être un mécanisme pouvant participer au développement de lésions de MAT et sa modulation pourrait donc constituer une voie thérapeutique dans le SHU³⁷¹. Cela suggère peut-être également l'intérêt de vacciner les patients à risque de SHU contre les germes susceptibles d'induire une désialylation (notons que le pneumovax 23 couvre actuellement toutes les souches de Pneumocoque impliquées dans la survenue d'un SHU).

2.3 Défaut de régulation du facteur de von Willebrand: déficit en ADAMTS-13

2.3.1 Le facteur de von Willebrand : description et régulation

Le facteur de von Willebrand (FvW) est une glycoprotéine plasmatique, qui participe de façon essentielle à l'hémostase primaire (adhésion et agrégation plaquettaire) et à la coagulation (transport du facteur VIII qu'il protège de la protéolyse). Il a une structure

multimérique, organisée en association de dimères, chaque dimère étant lui-même formé de deux monomères d'environ 250 kDa, reliés par des ponts disulfures³⁷². Il existe ainsi des multimères circulants du FvW de différentes tailles, variant de 500 à 20 000 kDa³⁷³, auxquelles s'ajoutent des formes dites de très hauts poids moléculaires (THPM) stockées dans les compartiments cellulaires et physiologiquement absentes du plasma.

Chaque monomère de FvW présente de nombreux sites de liaison, lui permettant d'interagir avec différents acteurs de l'hémostase (glycoprotéines plaquettaires GpIb ; intégrines plaquettaires α IIb β 3 (ou GpIIb/IIIa) ; facteur VIII ; chaîne α de la fibrine ; collagène ; héparine-sulfate). De fait, le pouvoir adhésif du FvW vis-à-vis du sous-endothélium et des plaquettes est directement proportionnel à sa taille. Il est, par ailleurs, exacerbé dans la microcirculation sanguine et les vaisseaux altérés, où les forces de cisaillement élevées favorisent le dépliage du FvW, ce qui augmente le nombre de sites d'interaction exposés.

Les multimères de THPM du FvW sont synthétisés dans les cellules endothéliales et les plaquettes. Ils sont stockés respectivement dans les corps de Weibel-Palade et les α -granules, compartiments cellulaires à partir desquels ils pourront être sécrétés dans le plasma, en quelques secondes, en réponse à différents stimuli (histamine, thrombine, protéines du complément, etc.). Une sécrétion constitutive existe également, à partir des cellules endothéliales, de multimères de plus petites tailles, qui sont alors sécrétés juste après leur synthèse vers les vaisseaux et la matrice extracellulaire.

Lors d'une lésion pariétale vasculaire, la mise à nu de la matrice extracellulaire induit une exposition du FvW lié au collagène du sous-endothélium, sur lesquels vont freiner les plaquettes via principalement leur récepteur GPIb. D'autre part, sont sécrétés des multimères de THPM, qui se déploient et interviennent dans l'agrégation plaquettaire en se liant aux intégrines plaquettaires α IIb β 3.

La régulation, dans le plasma, de la taille des multimères de FvW et donc de leur pouvoir adhésif est essentielle et repose principalement sur l'action de la métalloprotéase ADAMTS-13 (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin type 1 repeats*). Il s'agit d'une enzyme synthétisée principalement par le foie, mais aussi par les cellules endothéliales et les plaquettes. Elle est sécrétée dans le plasma sous forme active ($\approx 1 \mu\text{g/ml}$), où elle peut cliver spécifiquement le FvW, générant ainsi des multimères de plus

petits poids moléculaires. Elle intervient à la fois lors de la sécrétion endothéliale initiale des FvW de THPM, limitant leur mise en circulation, et au sein du clou plaquettaire, pour permettre sa résorption après réparation de la brèche vasculaire. Ainsi, un déficit en ADAMTS-13 peut induire la formation non régulée de thrombi plaquettaires (figure n°14).

Figure n°14 : Représentation schématique des conséquences in vivo d'un déficit en ADAMTS-13 (d'après Moake, NEJM, 2002) ²¹²

A/ L'ADAMTS-13 clive le FvW, par hydrolyse d'un pont peptidique Tyr842-Met843 situé dans son domaine A2. Ce site de clivage est cryptique au sein du FvW natif et ne devient accessible qu'après dépliement de la protéine.

B/ Un déficit quantitatif ou fonctionnel en ADAMTS-13 peut induire l'accumulation de multimères de THPM du FvW, et donc la formation non régulée de thrombi plaquettaires.

2.3.2 Le purpura thrombotique thrombocytopénique

Le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) est aujourd'hui défini comme une MAT secondaire à un déficit fonctionnel sévère en ADAMTS-13 (activité inférieure à 10 %). La première description sémiologique de ce syndrome a été réalisée par Moschowitz, en 1924, qui rapporta le cas d'une jeune fille de 16 ans décédée dans les suites d'un tableau associant anémie hémolytique, thrombopénie, fièvre, protéinurie et troubles neurologiques et dont l'autopsie montra de nombreux thrombi hyalins dans les microvaisseaux cérébraux, rénaux, hépatiques et spléniques³⁷⁴. La mise en évidence, chez les patients présentant un PTT, de multimères de THPM du FvW par Moake en 1982, suggéra l'existence d'une protéine capable de cliver le FvW³⁷³. L'ADAMTS-13 fut ainsi

découverte en 1996^{375,376}, et l'année suivante, un déficit de l'activité de cette protéase, était objectivé chez des patients souffrant de PTT³⁷⁷. Le déficit en ADAMTS-13 est pour l'heure rapporté à deux mécanismes : d'une part, à la présence d'auto-anticorps anti-ADAMTS-13³⁷⁸ (\approx 95% des cas), responsables des formes acquises de PTT, classiquement rencontrées chez des femmes adultes ; d'autre part, à la présence d'une mutation homozygote ou hétérozygote composite dans le gène de la protéase³⁷⁹, rendant compte des formes de PTT héréditaires (syndrome d'Upshaw-Shulman).

PTT et SHU partagent une sémiologie clinico-biologique et histologique proche, ce d'autant qu'une insuffisance rénale aigue, généralement plus modérée que dans le SHU, est rapportée chez environ la moitié des patients souffrant d'un PTT. Cela suggère des mécanismes lésionnels communs entre le déficit en ADAMTS-13 et les autres facteurs étiologiques avérés de MAT.

L'imputabilité du déficit en ADAMTS-13 dans la genèse de lésions de MAT a été confirmée dans un modèle de PTT acquis développé chez le primate. Feys et al ont, en effet, observé que l'administration d'anticorps murins anti-ADAMTS-13 à des babouins s'accompagnait, en l'absence d'autres facteurs déclenchant, dès 4 jours de traitement, d'un tableau de MAT disséminé³⁸⁰. A l'inverse, les souris chez qui la protéase était inactivée (délétion des exons 1 à 6 codant pour le domaine catalytique) restaient asymptomatiques, à moins d'un fond génétique de prédisposition et d'une exposition à un facteur déclenchant. Ainsi, dans leur modèle de souris déficientes en ADAMTS-13, Motto et al, ont observé une thrombopénie isolée en cas de fond génétique induisant un taux élevé de FvW circulant, et la survenue de lésions de MAT en cas d'injection supplémentaire de Shiga-toxines (Stx2)³⁸¹. Ce modèle se rapproche de ce qui est rapporté chez l'homme. En effet, la pénétrance et l'expression du déficit en ADAMTS-13 sont variables, tout comme dans les SHU associés à des anomalies de régulation du complément, suggérant, ici aussi, l'intervention d'autres facteurs. Les mêmes facteurs déclenchant que pour le SHU sont d'ailleurs décrits dans le PTT (grossesse/post-partum³⁸², infections³⁸³, néoplasie, médicaments^{384,385}), traduction probable de la nécessité préalable d'une activation endothéliale, responsable de la sécrétion de multimères de FvW.

2.3.3 Place du complément

Une activation du complément à la phase aigüe d'épisodes de PTT a été rapportée par plusieurs équipes. Reti et al, étudiant les marqueurs d'activation du complément chez 13 patients porteurs d'anticorps anti-ADAMTS 13, ont notamment décrits chez ces derniers, en phase aigüe et avant traitement, des taux plasmatiques plus élevés de C3a et C5b-9 solubles que chez des sujets contrôles sains. Ces taux, diminuaient après échanges plasmatiques et se normalisaient en phase de rémission, faisant suggérer une corrélation à l'activité de la pathologie³⁸⁶. Ruiz-Torres et al avaient préalablement rapportés une diminution des taux plasmatiques de C3 à la phase aigüe de la maladie chez 4/8 patients, porteurs pour la moitié d'un déficit héréditaire en ADAMTS 13 et pour l'autre d'un déficit acquis³⁸⁷. Cette équipe a décrit in vitro une augmentation des dépôts membranaires de C3 et de C5b-9 à la surface de cellules microvasculaires du derme (HMEC) exposées à du sérum de patients en comparaison à du sérum de sujets sains. Ils ont parallèlement montré, sous l'effet de sérums de patients, une activation des polynucléaires neutrophiles associée à la génération de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et à une cytotoxicité endothéliale, ainsi qu'une augmentation de l'adhésion plaquettaire aux cellules endothéliales. Ces effets n'étaient plus observés en présence de sérums décomplémentés³⁸⁷. Ce travail suppose un rôle important du complément et rend compte des interactions entre les différents acteurs cellulaires (cellules endothéliales, neutrophiles, plaquettes) et moléculaires (système du complément, de l'hémostase) impliquées dans la genèse des lésions de MAT.

L'hypothèse d'une participation du complément a récemment été confortée par l'utilisation avec succès d'Eculizumab chez une patiente porteuse d'anticorps anti-ADAMTS-13. Chapin et al ont, en effet, rapporté le cas d'une jeune femme présentant un PTT réfractaire aux différents traitements entrepris (échanges plasmatiques, stéroïdes, vincristine, Rituximab), chez qui une biopsie cutanée réalisée à 20 jours du diagnostic montrait des dépôts endothéliaux de C3d, C4d et C5b-9. Aucune anomalie dans les gènes du FH, FI, MCP ou FB n'était identifiée. L'utilisation à partir de J20 d'Eculizumab s'est accompagnée d'une rapide amélioration des paramètres d'hémolyse et de la fonction rénale³⁸⁸.

2.4 Autres facteurs étiologiques identifiés

Dans la classification proposée par Besbas et al en 2006²¹⁴, apparaît deux autres facteurs étiologiques de SHU, pour lesquels il n'y pour l'heure pas de lien décrit avec le complément : la quinine et les anomalies du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 ou cobalamine.

Brièvement, la quinine ou ses dérivés ont été impliqués dans la survenue de SHU, via un mécanisme probablement immuno-allergique. En effet, des anticorps dirigés contre divers épitopes des plaquettes, cellules endothéliales ou neutrophiles ont été identifiés chez les patients³⁸⁹ et des récurrences de SHU ont été observé chez des patients exposés de façon répétée à ces traitements³⁹⁰.

Les anomalies du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 sont décrites comme de rares causes de SHU qui s'expriment généralement chez le nourrisson, sous une forme souvent fatale en l'absence d'un traitement rapide par hydroxycobalamine. Sans pouvoir l'expliquer à part entière, l'hyperhomocystéinémie est suggérée comme l'un des mécanismes favorisant la survenue d'un SHU, via le développement de lésions endothéliales^{214,391}. Des déficits en vitamine B12 ont également été rattachés à la survenue de « pseudo-MAT »³⁹².

Cette classification va continuer d'évoluer avec l'avancée des connaissances sur la physiopathologie des MAT. Le déficit en VEGF (vascular endothelial growth factor) pourrait notamment constituer un autre mécanisme étiologique favorisant le développement d'un SHU. En effet, ce facteur de croissance angiogénique est particulièrement impliqué dans la survie des cellules endothéliales. Il intervient notamment dans leur protection vis-à-vis du complément en induisant une augmentation de la synthèse membranaire de DAF¹⁸⁹. Plusieurs syndromes de MAT ont ainsi été rattachés à une déplétion en VEGF, dans le cas notamment de traitements oncologiques par anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF³⁹³ ou de traitements par sirolimus, qui inhibe la sécrétion locale de VEGF³⁹⁴. Il a, par ailleurs, été rapporté dans des modèles de MAT rénales induites par perfusion artérielle rénale d'anticorps anti-cellules endothéliales chez des rats, que l'injection secondaire de VEGF₁₂₁ s'accompagnaient d'une réduction des lésions des artérioles et capillaires glomérulaires et péri-tubulaires^{395,396}.

Ainsi, le syndrome hémolytique et urémique est une pathologie complexe. De multiples acteurs peuvent interagir pour aboutir au développement des lésions de MAT, parmi lesquels le système du complément, via une activation excessive de sa voie alterne. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de ce chapitre, l'optimisation de la prise en charge thérapeutique passe par l'identification du ou des principaux mécanismes étiologiques en cause chez chaque patient présentant un SHU. Cependant, nous avons vu que même en l'absence d'anomalie sous-jacente de régulation du complément, ce système était également impliqué dans la physiopathologie de SHU rattachés à d'autres étiologies. Cela soulève notamment la question de l'élargissement des indications de l'Eculizumab dans ces autres formes, en particulier à la phase initiale de la pathologie. Cela suggère également l'intérêt de développer des tests permettant de statuer, de façon rapide et sensible, sur l'état d'activation du complément chez un patient présentant un SHU, de façon à guider éventuellement l'utilisation de ce traitement.

Chapitre 3 : Rôle de la dysfonction endothéliale et de l'hémolyse dans la genèse du SHU

Le SHU est donc une MAT à tropisme rénal, dont les facteurs étiologiques potentiels sont multiples. Si le complément joue un rôle indéniable dans la genèse des lésions de MAT, comme le suggère la fréquence des anomalies touchant ce système dans le SHU, il ne constitue cependant qu'un acteur parmi d'autres (anomalie du système de l'hémostase ; inducteur d'activation ou d'agression endothéliale). Ces facteurs conjuguent leurs effets, avec des degrés de participation variable en fonction du mécanisme étiologique prépondérant, pour aboutir à l'acquisition d'un phénotype microvasculaire prothrombotique.

Quelque soient les mécanismes initiaux en cause, les SHU partagent notamment deux dénominateurs communs. En premier lieu, une activation endothéliale dérégulée responsable d'une rupture de l'homéostasie vasculaire. Secondairement, une hémolyse intravasculaire, dont l'origine est rapportée traditionnellement à une lyse mécanique des érythrocytes contre les mailles des thrombi fibrino-plaquettaire formés au sein des microvaisseaux. L'objectif de ce chapitre est donc de présenter les principales caractéristiques de ces deux dénominateurs.

1. Dysfonction endothéliale aiguë

L'endothélium occupe une position stratégique à l'interface entre les secteurs plasmatiques et tissulaires et constitue un acteur essentiel de l'homéostasie vasculaire. Il est sensible à une grande variété de stimuli environnementaux, chimiques, physiques ou humoraux, qui induisent, en réponse, la libération de nombreux facteurs impliqués dans la régulation de la vasomotricité, de la perméabilité vasculaire, de l'immunité innée et adaptative, des différentes étapes de l'hémostase, ainsi que dans la régulation de la prolifération et la survie des cellules musculaire lisses et de l'angiogenèse.

En conditions basales, l'endothélium sain, non activé, est relativement quiescent (durée de vie moyenne des cellules endothéliales supérieure à 1 an)³⁹⁷. Sa perméabilité est limitée aux fonctions physiologiques de transfert des nutriments et d'épuration. Il synthétise préférentiellement des facteurs de relaxation vasculaire et prévient la formation de thrombi de par les propriétés non-thrombogéniques, non-coagulantes, pro-fibrinolytiques de sa surface. Enfin, il exprime peu de molécules d'adhérence leucocytaire^{397,398}.

A l'inverse, son activation, en réponse à une agression, induit une bascule de son phénotype vers un profil proinflammatoire et prothrombotique. En cas de défaillance des systèmes de régulation, ce processus physiologique peut alors devenir délétère, comme par exemple dans les SHU associés à des anomalies du complément.

1.1 Structure de l'endothélium

L'endothélium est une monocouche de cellules endothéliales pavimenteuses, tapissant la surface de l'ensemble de l'arbre vasculaire et qui constitue ainsi une surface d'échange estimée entre 3 et 7 m²^{399,400}.

Les cellules endothéliales partagent un certain nombre de caractéristiques communes. Elles présentent, cependant, une hétérogénéité de structure et de fonction selon les segments vasculaires (artères, artérioles, capillaires, veinules post-capillaires, veines) et les tissus irrigués, comme le confirme des profils d'expression génique différents⁴⁰¹. Cette hétérogénéité permet les multiples fonctions de l'endothélium et rend probablement compte de la variabilité d'expression des pathologies vasculaires en fonction du site lésionnel initial. La microcirculation, notamment, constitue le lit vasculaire au sein duquel se développent les MAT.

1.1.1 *Caractéristiques de la microcirculation*

La microcirculation regroupe les vaisseaux de petits diamètres, classiquement inférieurs à 200-300µm (artérioles, capillaires et veinules) et représente la surface endothéliale la plus

étendue de l'organisme (50 fois supérieure à celle de la macrocirculation)⁴⁰². Elle est notamment responsable de la distribution des nutriments et oxygène aux tissus (réseau distributif) et d'une grande part des résistances vasculaires périphériques (réseau résistif). Comparativement aux macro-vaisseaux, caractérisés histologiquement par la superposition de trois tuniques (intima, media, adventice), la structure des capillaires se résume à un endothélium, une lame basale et une fine couche de conjonctif sous-endothélial, auxquels s'ajoutent quelques cellules musculaires lisses (péricytes). Les artérioles disposent, en plus, d'une couche de cellules musculaires lisses (figure n°15).

Figure n°15 : Structure des différents segments de l'endothélium microvasculaire (d'après Benjamin/Cummings Publishing Company, 2004)

Les artérioles sont principalement responsables du tonus vasculaire et régulent la distribution du débit sanguin dans les lits capillaires d'aval. Elles constituent, de fait, les principaux contributeurs des résistances périphériques.

Le réseau capillaire se caractérise notamment par un régime de basse pression et de faibles vitesses d'écoulement (<1mm/sec), facilitant ainsi les échanges plasma/tissus, qui constituent leur principale fonction. Le diamètre des capillaires est compris entre 4 et 10 μm et la paroi endothéliale est fine d'environ 0,5 μm . L'architecture des capillaires et les caractéristiques de leur endothélium diffèrent selon les tissus et les organes, déterminées par les fonctions et les besoins énergétiques de ces derniers. Les capillaires peuvent ainsi être : i/ continus non fenêtrés (cerveau, rétine), peu perméables ; ii/ continus fenêtrés

(reins, glandes endocrines, villosités intestinales), de perméabilité intermédiaire ; iii/ discontinus (foie, rate, moelle osseuse), dits capillaires sinusoides, les plus perméables³⁹⁷.

1.1.2 Les différents composants de l'endothélium

L'endothélium microvasculaire se compose principalement de trois acteurs - les cellules endothéliales, le glycocalyx et la membrane basale sous-endothéliale - qui coopèrent, permettant ainsi l'expression des différentes fonctions endothéliales.

Figure n°16 : Les différents acteurs de l'endothélium microvasculaire (adapté de Rabelink et al, Nature Review Nephrology, 2010)⁴⁰³

Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont liées entre elles par différents types de jonction intercellulaire (serrées, communicantes, adhérentes), formant ainsi une barrière sélectivement perméable entre secteur vasculaire et espaces sous-endothéliaux. Alors que les jonctions serrées, zones de fusion membranaire parfaitement étanche, prédominent dans le système artériel, elles sont plus rares, au profit de jonctions adhérentes, au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires (à l'exception des capillaires cérébraux). Le niveau de perméabilité basale, par diffusion paracellulaire, est donc plus important dans la

microcirculation⁴⁰⁴. Cette perméabilité peut être rapidement augmentée via des phénomènes de rétraction cellulaire et/ou la formation de brèches intercellulaires (gap), notamment sous l'effet de la thrombine ou de l'histamine^{405,406}. Les autres éléments impliqués dans la perméabilité endothéliale sont les protéines de surface, la charge électrostatique de la membrane endothéliale, la composition de la membrane basale et la richesse en dispositifs de transport trans-cellulaire, notamment en clathrines et cavéoles. Concernant les spécificités de synthèse de l'endothélium microvasculaire, il a notamment été rapporté : que l'expression inductible des molécules d'adhérences E-selectine, P-selectine, ICAM-1 (CD54) et VCAM-1 (CD106) prédominaient au niveau des veinules post-capillaires, site préférentiel de l'adhérence leucocytaire^{397,407,408} ; que le TFPI, inhibiteur endothéliale du facteur tissulaire, était richement exprimé à sa surface^{409,410} ; que la thrombomoduline était absente de l'endothélium cérébral⁴¹¹.

La membrane basale sous-endothéliale

De façon générale (à l'exception de certains capillaires discontinus), l'endothélium repose sur une membrane basale sous-endothéliale, qu'il participe à synthétiser. Cette matrice extracellulaire est particulièrement riche en collagène, en particulier de type IV et en glycoprotéines adhésives (fibronectine, laminine). Ces constituants contribuent à lui conférer sa résistance, nécessaire à l'intégrité vasculaire, ainsi que ses caractéristiques biochimiques, qui font de ce sous-endothélium un puissant activateur des plaquettes et de la coagulation⁴¹². En effet, en cas d'altération lésionnelle ou d'augmentation de la perméabilité, l'espace sous-endothélial peut exposer les facteurs nécessaires à l'adhérence et à l'agrégation plaquettaire ainsi qu'à l'initiation de la coagulation. Par ailleurs, Hindmarsh et al ont observé, sur un modèle d'HUVECs prétraitées par cytokines (IL-1 β , TNF α , IFN γ), une colocalisation des dépôts de C3b avec la matrice extracellulaire, exposée par rétraction cellulaire sous l'effet des cytokines. Ils ont confirmé secondairement une activation du complément, par la voie alterne, à la surface de certaines protéines composant la matrice extracellulaire, en particulier la vitronectine et la fibronectine⁴¹³.

Le glycocalyx

La surface luminale des cellules endothéliales est recouverte par le glycocalyx, dont l'importance a été suggérée précédemment lors de la description des SHU associés à

Streptococcus pneumoniae. Ce « manteau » endothélial, dont l'épaisseur varie entre 0,1 et 1µm en fonction du site vasculaire, est principalement constitué de protéoglycannes, en particulier de syndecan, porteurs de différents glycosaminoglycannes (GAG)⁴¹⁴. Parmi eux, l'héparane-sulfate et les dermatane/chondroïtine-sulfates sont les plus abondants et rendent compte de la charge négative de la membrane cellulaire. Le glycocalyx participe, de façon fondamentale, à la perméabilité sélective de l'endothélium, ainsi qu'à ses propriétés naturellement anti-thrombogènes et anti-inflammatoires. Son organisation en réseau de GAG enchevêtré et sa charge négative constitue une première barrière, qui intervient dans la régulation du trafic cellulaire et macromoléculaire, en repoussant notamment les protéines plasmatiques chargées négativement⁴¹⁵. Il limite également l'adhérence des plaquettes et des leucocytes circulants, dont les surfaces sont aussi chargées négativement^{416,417}. Il maintient un environnement anti-coagulant via notamment l'héparane sulfate, qui est un cofacteur de l'antithrombine⁴¹⁸, et le dermatane sulfate, qui interagit avec le cofacteur II de l'héparine, inhibiteur de la thrombine. Le glycocalyx constitue, par ailleurs, un réservoir de médiateurs anti-inflammatoires et notamment d'enzymes anti-oxydantes comme la superoxyde-dismutase (SOD) et il est impliqué dans la transduction des signaux de shear-stress, issus des forces de cisaillement, aux cellules endothéliales⁴⁰³. Enfin, les protéoglycannes de la surface cellulaire sont capables de fixer les chimiokines à la surface des cellules endothéliales, créant un gradient chimioattractant vis-à-vis des leucocytes circulants. On comprend ainsi qu'une altération du glycocalyx puisse participer au développement de lésions endothéliales.

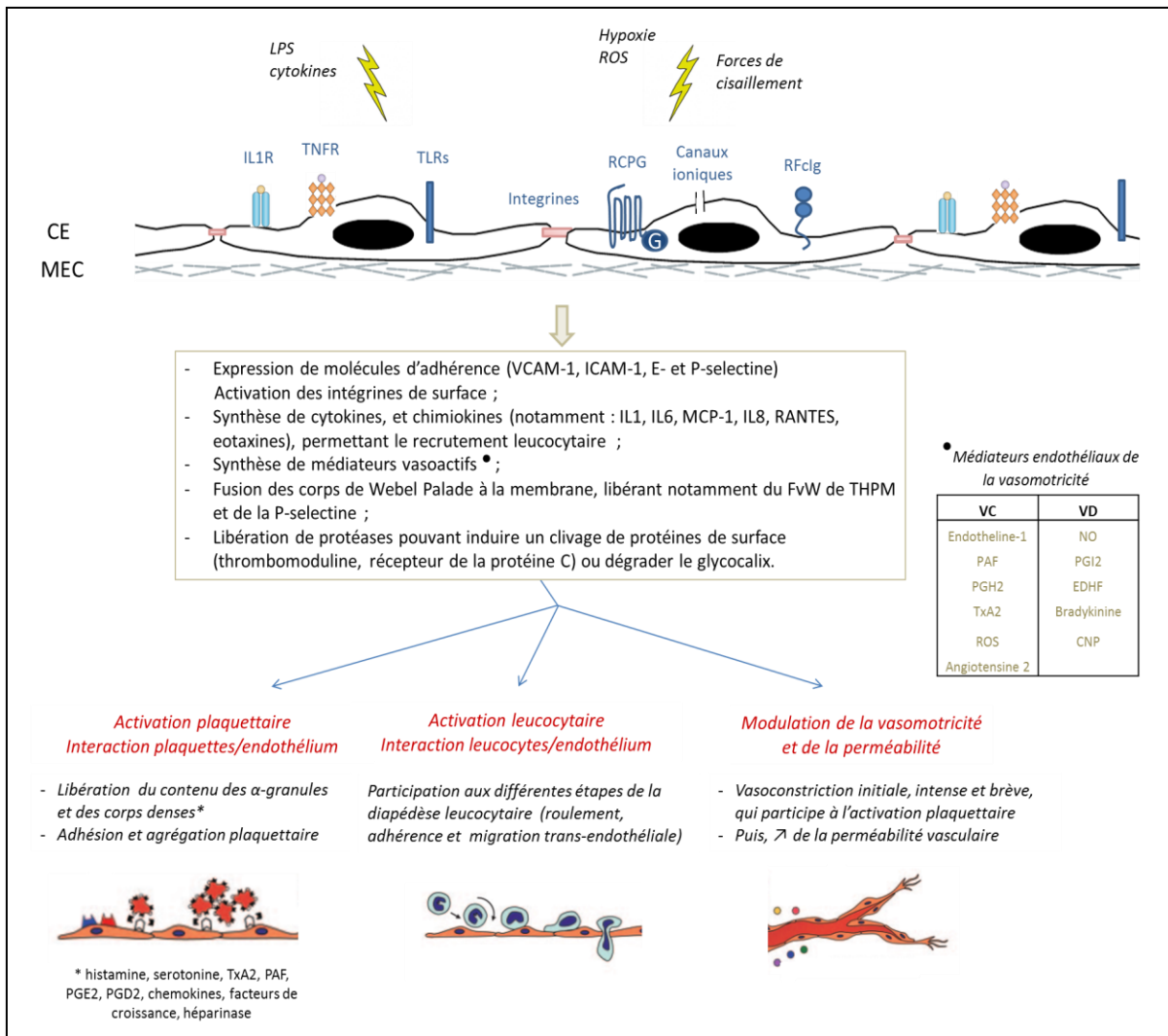
1.2 Principales conséquences de l'activation endothéliale aigue

1.2.1 Acquisition d'un phénotype proinflammatoire

Les cellules endothéliales disposent à leur surface de nombreux récepteurs. Leur activation, sous l'effet de différents stimuli, tels que le TNF α , l'IL-1, les endotoxines bactériennes ou divers stress, hypoxique ou métabolique, s'accompagne de la sécrétion ou de la synthèse,

via la mise en jeu de différentes voies de signalisation, de nombreux médiateurs qui participent au processus inflammatoire et à son contrôle^{398,399,419,420}. Les principales conséquences de cette activation sont résumées dans la figure n°17.

Figure n°17 : Principales conséquences de l'activation endothéliale aigue (à l'exception des effets sur l'hémostase qui seront traités indépendamment)



CE : Cellule endothéliale, **CNP** : Peptide natriurétique de type C, **EDHF** : Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, **IL1R** : Récepteur à l'IL1, **LPS** : Lipopolysaccharide, **MEC** : Matrice extra-cellulaire, **NO** : monoxyde d'azote, **PAF** : platelet activating factor, **PG** : Prostaglandine, **RCPG** : Récepteur couplé aux protéines G, **RFcIg** : Récepteur aux fragments Fc des Ig, **ROS** : espèces réactives de l'oxygène, **TLR** : Toll like receptor, **TNFR** : Récepteur au TNF, **TxA2** : Thromboxane A2.

D'autre part, l'endothélium constitue un site de production extra-hépatique important des composants du complément, ce qui participe probablement à l'activation locale de ce système. Il a été rapporté, sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires ou des forces de cisaillement, une augmentation de la synthèse endothéliale (principalement sur des HUVECs) de properdine⁴²¹, FB⁴²², C3⁷⁹, des composants du complexe terminal C5, C6, C8 et C9⁴²³ et de régulateurs tels que le FH¹⁴¹ et le FI⁴²⁴. Comme nous l'avons vu précédemment, cette synthèse extra-hépatique est particulièrement importante au niveau rénal, où il a notamment été observé une synthèse de C3 et de C4 par les cellules endothéliales glomérulaires^{82,425}.

1.2.2 Acquisition d'un phénotype prothrombotique

Les cellules endothéliales quiescentes expriment majoritairement des facteurs antithrombotiques. En cas d'activation de l'endothélium, il survient une modulation de la synthèse des différents médiateurs de l'hémostase par les cellules endothéliales, responsable de la bascule de leur phénotype vers un profil prothrombotique.

Les principaux médiateurs endothéliaux de l'hémostase sont répertoriés dans le tableau n°2 (p.88).

Parmi eux, le FvW est très rapidement sécrété après activation endothéliale à partir des corps de Weibel-Palade. Il constitue un acteur essentiel de l'hémostase primaire, en participant à l'adhésion et à l'agrégation plaquettaire. Ses caractéristiques, ainsi que son implication dans la physiopathologie des MAT ont été décrites précédemment (p.73). Ici, seront abordées plus spécifiquement les caractéristiques des acteurs endothéliaux de la coagulation et de la fibrinolyse.

Tableau n°2 : Médiateurs endothéliaux impliqués dans la régulation de l'hémostase

	Facteurs prothrombotiques	Fonctions	Facteurs anti-thrombotiques	Fonctions
Régulation de l'hémostase primaire	FvW	- Adhésion et agrégation plaquettaire - Transport du FVIII	ADAMTS-13	Clivage des multimères de THPM du FvW
	Thromboxane A2	- Agrégation plaquettaire - Vasoconstriction	NO	- Inhibition de l'activation plaquettaire - Vasorelaxation - Propriétés anti-inflammatoires
	PAF	- Agrégation plaquettaire - Vasoconstriction	PGI2	- Inhibition de l'activation plaquettaire - Vasorelaxation
			Héparanes-sulfate	Répulsion par leur charge négative
Régulation de la coagulation	Facteur Tissulaire	- Liaison au FVII et activation de la cascade de la coagulation	TFPI	Inhibition de la coagulation par liaison avec le FT, les facteurs Va et Xa
	PARs	- Récepteur de la thrombine (PARs 1, 3 et 4) - Effets pro-inflammatoires	Thrombomoduline	Complexé la thrombine et augmente son affinité pour le précurseur de la protéine C au détriment du fibrinogène
			EPCR	Activation de la protéine C, qui inhibe les facteurs Va et VIIIa
			Héparanes- sulfate	Lie l'antithrombine, qui inhibe la thrombine
Régulation de la fibrinolyse	PAI-1	Action anti-fibrinolytique	t-PA, u-PA	Action pro-fibrinolytique

FvW : Facteur von Willebrand, **EPCR** : Récepteur de la protéine C, **NO** : monoxyde d'azote, **PAI-1** : Inhibiteur de type 1 de l'activateur du plasminogène, **PAF** : platelet activating factor, **PARs** : protease activated receptor, **PG** : Prostaglandine, **ROS** : espèces réactives de l'oxygène, **t-PA** : Activateur tissulaire du plasminogène, **TFPI** : Tissue Factor pathway Inhibitor, **u-PA** : Urokinase.

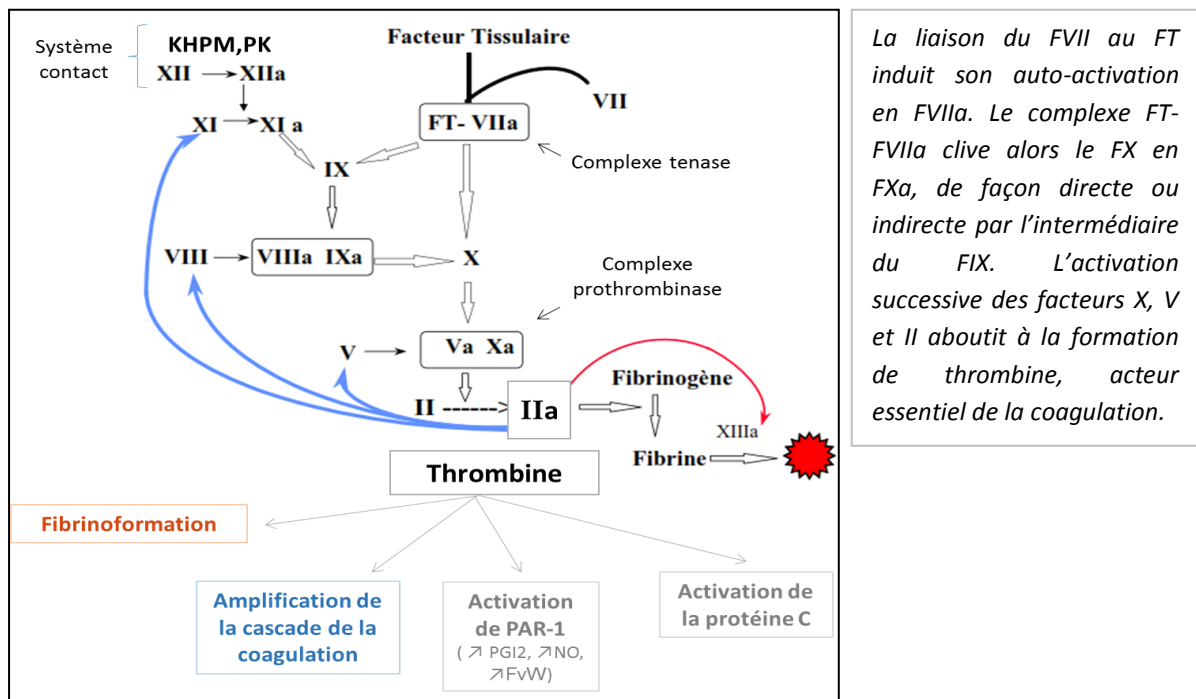
1.2.2.1 Coagulation et fibrinolyse : Généralités

- Le facteur tissulaire (FT) est l'élément initiateur de la coagulation in vivo. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire possédant une très haute affinité pour le facteur VII (FVII). La liaison FT-FVII déclenche la cascade protéolytique de la coagulation jusqu'à la formation de thrombine (facteur IIa), capable de générer la fibrine, de stabiliser le thrombus et d'amplifier secondairement ce processus. Cette cascade se caractérise par une série de réactions enzymatiques dont les facteurs, le plus souvent des protéases à

sérine, circulent dans le plasma sous forme inactive. Ils sont activés par hydrolyse partielle, qui démasque ainsi leur site actif. Ces réactions protéolytiques, en majorité calcium-dépendante, s'opèrent localement au contact des surfaces phospholipidiques des membranes plaquettaires et endothéliales.

Le système de la coagulation a également des propriétés proinflammatoires. D'une part, comme nous l'avons vu précédemment, certains composants de ce système sont capables de cliver directement les protéines C3 et C5 du complément (voie des protéases extrinsèques)^{21,22}. D'autre part, certains produits d'activation de la cascade de la coagulation, en particulier la thrombine, mais aussi les FVIIa, FXa, peuvent lier et activer les PARs (protease activated receptor). Ces récepteurs membranaires, dont 4 sont actuellement identifiés, appartiennent à la famille des protéines couplés aux protéine G. PAR-1 est le mieux connu, il est notamment retrouvé à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales, en particulier dans le rein⁴²⁶. L'activation par clivage des PARs par leurs ligands peut induire différents effets⁴²⁷, et notamment dans le cas de l'activation de PAR-1 par la thrombine, la synthèse de eNOS, de prostacycline et la mobilisation des corps de Weibel-Palade³⁹⁹.

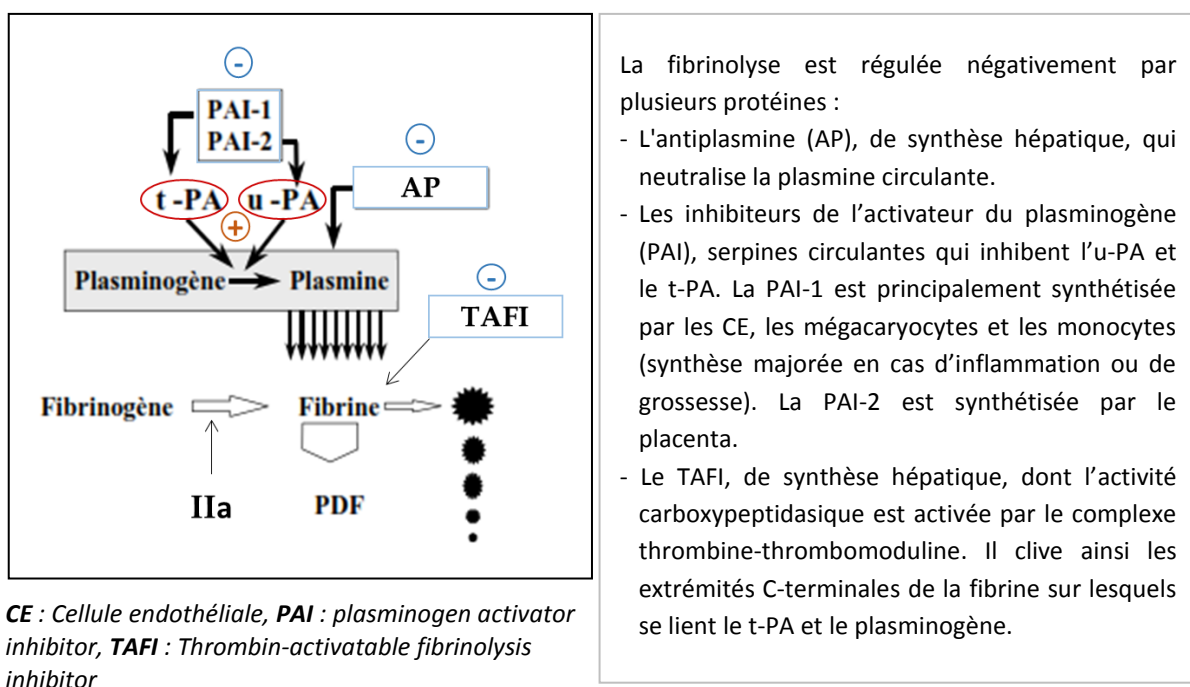
Figure n°18 : Le système de la coagulation et les différentes fonctions de la thrombine



KHPM : Kininogène de haut poids moléculaire, **PK** : Prékallitréine,

- La fibrinolyse limite l'extension du thrombus et reperméabilise les vaisseaux. Elle est déclenchée par la plasmine, une protéase à sérine capable de dégrader les caillots de fibrine, qui circule dans le plasma sous forme de plasminogène inactif⁴²⁸. L'activation du plasminogène, glycoprotéine plasmatique de synthèse hépatique, est sous la dépendance de deux protéines : 1/ l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), sécrété par les cellules endothéliales sous l'effet de divers stimuli (thrombine, TNF, hypoxie) ; celui-ci a une haute affinité pour la fibrine, en particulier pour le complexe plasminogène/fibrine, de sorte que son activité reste principalement localisée au thrombus ; 2/ l'urokinase (u-PA), notamment synthétisée par les cellules endothéliales et les monocytes/macrophages sous forme de pro-urokinase. La liaison de la pro-urokinase au plasminogène induit son activation en urokinase, qui se lie alors à son récepteur de haute affinité u-PAR et induit la formation locale de plasmine à la surface cellulaire, rendant compte du rôle prédominant de l'u-PA dans les processus de remodelage⁴²⁹.

Figure n°19 : Le système de la fibrinolyse et sa régulation



1.2.2.2 Facteur tissulaire et TFPI : implication dans les MAT

Physiologiquement, le FT est strictement extravasculaire. Il est exprimé à la surface des cellules musculaires lisses et des fibroblastes et c'est donc l'effraction vasculaire, par lésion directe ou par rétraction cellulaire, qui induit son exposition et permet son contact avec le facteur VII circulant⁴³⁰. En conditions pathologiques, il peut également être synthétisé par les cellules endothéliales, les monocytes et les neutrophiles sous l'effet notamment de cytokines proinflammatoires (TNF α , IL-1, IL-6), d'endotoxines bactériennes (LPS)⁴³¹ ou de fragments activés du complément, en particulier C5a et CAM sublytique^{47,64,432}. Son activité est contrôlée par le TFPI (tissue factor pathway inhibitor). Cette protéine, est principalement synthétisée par l'endothélium, en particulier microvasculaire, ainsi que par les mégacaryocytes⁴³³. Le TFPI inhibe le FXa, soit directement, soit indirectement via la formation d'un complexe quaternaire FT/TFPI/FVIIa /FXa.

L'importance de ce facteur anticoagulant est suggéré par les modèles murins déficitaires en TFPI fonctionnel, qui décèdent in utero de coagulopathie intravasculaire dans les formes homozygotes, tandis que les souris hétérozygotes augmentent leur susceptibilité prothrombotique lorsqu'existe une autre anomalie tel qu'un déficit en thrombomoduline ou une mutation du FV Leiden^{434,435}. Hormis quelques études rapportant une diminution du TFPI dans le PTT⁴³⁶, il n'y a pas d'anomalies spécifiques décrites de cette protéine dans les MAT. Par ailleurs, si le rôle potentiellement néfaste du FT est depuis longtemps suggéré dans le choc septique, où il a été montré sur modèle animal que son inhibition réduisait la coagulopathie et la létalité⁴³⁷, aucune anomalie spécifique de cette protéine n'a, pour l'heure, été identifiée chez les patients souffrant de MAT. Seshan et al ont rapporté, néanmoins, dans un modèle murin de MAT rénale induit par anticorps anti-phospholipides, que les souris exprimant constitutionnellement moins de FT présentaient significativement moins de lésions glomérulaires⁴³⁸.

1.2.2.3 Thrombine et régulateurs : implication dans les MAT

La thrombine est un élément clé de la coagulation, dont elle est à la fois l'effecteur final et un régulateur. Elle catalyse le clivage spécifique du fibrinogène et l'activation des facteurs V, VIII, XI et XIII ainsi que celle de protéines régulatrices de la coagulation (protéine C) ou de la

fibrinolyse (TAFI). La thrombine est inhibée par l' α 2-macroglobuline, les serpinés (antithrombine, héparine cofacteur II et protéase nexine I) et pharmacologiquement, par l'hirudine. Son activité est, par ailleurs, régulée par la thrombomoduline (THBD).

La THBD est une protéine membranaire, qui peut complexer la thrombine et augmenter l'affinité de celle-ci pour la protéine C au détriment du fibrinogène. Elle est majoritairement synthétisée par les cellules endothéliales et ce, de façon ubiquitaire (à l'exception des vaisseaux cérébraux⁴¹¹). Sa transcription est stimulée par les forces de cisaillement, tandis qu'elle est inhibée par le TNF- α ou l'IL-1. Elle participe donc à l'activation de la protéine C, qui peut alors dégrader de façon irréversible les cofacteurs Va et VIIIa et inhiber le PAI-1³⁹⁹. Par ailleurs, la THBD possède une activité anticoagulante propre par inhibition du complexe prothrombinase via une liaison au FXa⁴³⁹ ainsi que des propriétés fibrinolytiques via l'activation du TAFI⁴⁴⁰. Elle est également impliquée dans la régulation du complément, ce qui a conduit à son étude chez les patients souffrant de SHU atypique. En effet, la THBD potentialise l'action du FH en tant que cofacteur du FI pour le clivage du C3b²³¹. D'autre part, elle active le TAFI, dont l'activité carboxypeptidasique permet le clivage des anaphylatoxines C3a et C5a^{441,442}.

Outre la place de la THBD dans le SHU²³¹, d'autres arguments existent suggérant qu'une activation excessive de la coagulation ou un défaut de fibrinolyse puisse favoriser le développement d'un SHU.

Parmi des sujets infectés à *E. coli* O157 :H7, l'évolution vers un SHU a été corrélée à des taux de prothrombine 1+2, d'inhibiteur de type I de l'activateur du plasminogène, de complexes t-PA/PAI-1 et de D-dimères plus élevés au cours de la phase prodromique⁴⁴³. Une augmentation de ces produits, en particulier de thrombine et du PAI-1, avait déjà été ponctuellement rapportée au cours du SHU^{444,445}. Dans un modèle canin de SHU induit par injection de Stx, Raife et al ont également observé une élévation des taux de prothrombine 1+2 et de fibrinogène, et suggéré l'intérêt d'inhiber la thrombine devant le constat que les chiens prétraités par de l'hirudine présentaient une évolution plus favorable⁴⁴⁶.

Par ailleurs, alors que le PAI-1 est physiologiquement absent des reins normaux, il est exprimé en regard des lésions de MAT, glomérulaires et artériolaires^{447,448}. Une diminution de l'expression glomérulaire d'ARNm de t-PA a également été observée dans les reins avec

microangiopathie thrombotique⁴⁴⁸, ce qui associée à l'augmentation de PAI-1, est susceptible de rendre compte d'un état prothrombotique par inhibition de la fibrinolyse.

Ainsi, la rupture de l'équilibre homéostatique vers un état procoagulant ou anti-fibrinolytique constitue très probablement un élément clé de la physiopathologie des SHU et autres MAT. Néanmoins, pour l'heure, il n'a pas été montré de bénéfice évident à l'utilisation d'anti-agrégant-plaquettaire, d'anticoagulant ou de profibrinolytique dans le SHU⁴⁴⁹.

2. Rôle de l'hémolyse

2.1 Catabolisme de l'hémoglobine

2.1.1 L'hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) est une protéine abondante ($\approx 15\text{g/dL}$), strictement compartimentée dans les érythrocytes, au sein desquels elle permet le stockage et le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone entre tissus et poumons, où ont lieu les échanges gazeux.

L'Hb est une chromoprotéine porphyrinique appartenant à la superfamille des globulines. Il s'agit d'un hétérotétramère de 64 kDa, formé de 4 sous-unités globulaires identiques, les globines, et de 4 molécules d'hème. Les globines constituent la fraction protéique de l'Hb et sont chacune constituées, chez l'adulte, de deux couples de chaînes polypeptidiques, α et β ($\alpha_2\beta_2$). Chaque globine porte en son centre une molécule d'hème, qui est formée d'une protoporphyrine IX constituée de 4 noyaux pyrroles et, en situation basale, d'un atome de fer ferreux (Fe^{2+}) apolaire⁴⁵⁰.

L'hème est abrité au sein d'une « poche » hydrophobe, environnement qui protège l'atome de fer de l'oxydation et lui permet d'être maintenu à l'état ferreux lors des étapes d'oxygénation/désoxygénation. En cas d'oxydation, cet atome perd un électron, passant

ainsi à l'état ferrique (Fe^{3+}). L'hème est alors appelé hématine et l'hémoprotéine, méthémoglobine ou ferrihémoglobine⁴⁵¹.

Figure n°20 : Structure de l'hémoglobine et de ses dérivés (adaptée de Kumar et al, Tox.Letters 2005)⁴⁵²

2.1.2 Hémostase extravasculaire

L'hémolyse physiologique est majoritairement extravasculaire. Les érythrocytes sénescents, après une durée de vie moyenne d'environ 120 jours, sont phagocytés par les macrophages du système réticulo-endothélial, au niveau de la moelle osseuse ainsi qu'au niveau splénique et hépatique⁴⁵³. L'hémoglobine est ainsi dégradée : les acides aminés des globines sont recyclés, le fer est stocké au sein des macrophages en se liant à la ferritine cytosolique et la protoporphyrine IX est catabolisée en biliverdine puis bilirubine libre, qui, liée à l'albumine, est transportée jusqu'au foie où elle est conjuguée puis éliminée dans les selles sous forme de stercobilinogène.

2.1.3 Hémostase intravasculaire

Environ 10 à 20% de l'hémolyse physiologique est intravasculaire⁴⁵⁴, exposant potentiellement l'organisme aux effets toxiques de l'hémoglobine libre et de ses dérivés.

Ces derniers sont, de fait, immédiatement pris en charge par deux protéines, l'haptoglobine et l'hémopexine.

En cas d'hémolyse intravasculaire massive, observée dans diverses situations ou pathologies telles que les MAT, ces systèmes de détoxification et de clairance sont dépassés, entraînant une accumulation d'Hb libre dans la circulation.

2.1.3.1 Devenir de l'hémoglobine libre

L'hémoglobine libre se dimérise dans le plasma. Si elle n'est pas captée par l'haptoglobine, elle subit alors une oxydation via différents mécanismes⁴⁵⁵ :

- l'auto-oxydation : l'oxyHb libérée dans le plasma peut spontanément s'auto-oxyder, formant ainsi de la ferrihémoglobine (Hb-Fe³⁺) et un radical superoxyde (O₂^{•-}) ;
- la dioxygénation du monoxyde d'azote (NO) : l'oxyHb a une très forte affinité pour le NO plasmatique, à l'origine d'une réaction irréversible de dioxygénation du NO, qui génère de la ferrihémoglobine et du nitrate (NO₃⁻).

L'anion radical superoxyde, formé lors de l'auto-oxydation de l'oxy-Hb, est dismuté en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), capable d'interagir avec les atomes ferriques. Cette réaction forme des radicaux peroxydes (ROO[•]) et des atomes ferryl (Fe⁴⁺), qui possèdent également de fortes propriétés pro-oxydantes.

Par ailleurs, la ferrihémoglobine formée peut se dissocier et libérer son hème ferrique, dont les effets toxiques viennent s'ajouter à ceux des radicaux libres formés.

De fait, plusieurs systèmes de détoxification doivent coopérer pour empêcher la circulation d'Hb et d'hème libre.

2.1.3.2 Prise en charge de l'hémoglobine libre

L'haptoglobine (Hp) constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les effets délétères de l'hémoglobine libre.

Il s'agit d'une glycoprotéine plasmatique abondante (0,3-3g/L), de type α₂globuline, qui appartient aux protéines de la phase aiguë de l'inflammation et dont l'expression est donc induite sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires⁴⁵⁶. Elle est de synthèse

majoritairement hépatique, mais peut localement être produite par différents tissus, notamment rénal⁴⁵⁷.

Elle est généralement composée de 4 sous-unités α et β , organisées en dimères ($\alpha\beta$) reliées entre eux, au niveau de leurs sous-unités α , par un pont disulfure. Chaque sous-unité β peut lier un dimère d'hémoglobine⁴⁵⁸. Bien que non covalente, cette liaison Hb-Hp est solide, marquée par une très forte affinité calcium-dépendante (K_d 10^{-15} et courbe de dissociation lente)⁴⁵⁹.

Le complexe Hb-Hp est ensuite capté par un récepteur piègeur (« scavenger ») transmembranaire, le CD163, qui est hautement et exclusivement exprimé par les cellules de la lignée monocytaire, en particulier par les cellules de Kupffer et les macrophages circulants⁴⁶⁰. Son expression peut notamment être augmentée sous l'effet des glucocorticoïdes^{461,462}. Le complexe Hb-Hp est ensuite internalisé par endocytose médiée par le récepteur, puis les globines dégradées dans le lysosome et les molécules d'hème catabolisées par l'hème-oxygénase au sein du cytosol.

D'autres systèmes peuvent, à minima, relayer, en cas d'hémolyse massive, l'haptoglobine, qui est alors consommée. L'Hb non complexée peut se lier au récepteur CD163 (alors qu'il ne lie pas l'haptoglobine isolée)^{460,463}, ainsi qu'à une autre protéine circulante, l'Hpr (Haptoglobine-related protein)⁴⁶⁴.

2.1.3.3 Prise en charge de l'hème libre

Lorsque ce premier système de détoxification est saturé, l'hémoglobine libre est, d'une part filtrée par les glomérules rénaux, à l'origine d'une hémosidérinurie puis d'une hémoglobinurie lorsque les capacités de réabsorption des cellules tubulaires sont dépassées, et d'autre part s'oxyde en ferrihémoglobine qui se dissocie en globine et hématine.

L'hématine est rapidement captée par l'hémopexine circulante, qui constitue donc la seconde ligne de défense de l'organisme vis-à-vis des produits d'oxydation de l'Hb.

L'hémopexine (Hx) est une glycoprotéine sérique d'environ 60 kDa, migrant dans la zone des β 1-globulines. Sa synthèse est aussi principalement hépatique et majorée par l'inflammation, rendant compte d'une concentration plasmatique de l'ordre de 0,5 à 1,15

g/L⁴⁶⁵. Elle est également exprimée par les cellules du système nerveux central⁴⁶⁶, par les photorécepteurs de la rétine et par les cellules mésangiales rénales⁴⁶⁷.

Elle forme un complexe équimoléculaire hématine-hémopexine, de très haute affinité ($K_d \approx 10^{-13}$ M)⁴⁶⁷. Cette liaison induit un changement conformationnel de l'hémopexine, qui lui permet de se lier à son récepteur, le LRP (low density lipoprotein receptor-related protein) ou CD91. Celui-ci appartient à la superfamille des récepteurs aux LDL, possède une quarantaine de ligands et à ce titre de multiples fonctions⁴⁶⁸. Il s'agit d'une protéine transmembranaire, d'expression moins spécifique que le CD163, retrouvée à la surface des macrophages circulants mais aussi des hépatocytes, fibroblastes, adipocytes, neurones⁴⁶⁹. Le complexe hématine-Hx est ensuite pris en charge par CD91, de façon similaire au complexe ferrihémoglobine-Hp par CD163, à savoir via une internalisation par endocytose, puis la dégradation de l'hématine par l'hème oxygénase cytosolique et libération du fer qui se lie à la ferritine intracellulaire⁴⁷⁰. D'autre part, tout comme l'haptoglobine, l'hémopexine est dégradée dans le lysosome, de sorte que la consommation de ces deux protéines par, respectivement, l'hémoglobine et l'hème libre, aboutit à leurs rapides déplétions plasmatiques.

Lorsque l'hémopexine est saturée, l'hématine peut se lier à d'autres protéines circulantes, dont l'albumine ($K_d \approx 10^{-8}$ M), l'HCP1 (heme carrier protéin 1)⁴⁷¹ et la lipocaline $\alpha 1$ microglobuline⁴⁷². Elle lie également avec une forte affinité ($K_d \approx 10^{-10}$ M) les lipoprotéines, ce qui constitue l'un de ses mécanismes de toxicité⁴⁷³.

2.1.3.4 L'hème-oxygénase

Le système hème-oxygénase est le principal mécanisme physiologique de dégradation de l'hème, dont le catabolisme constitue un mécanisme de protection vis-à-vis du stress oxydatif qu'il engendre. En effet, les produits de dégradation de l'hémoglobine, en particulier le dioxyde de carbone et la bilirubine, ont de fortes propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires⁴⁵⁵.

L'hème-oxygénase (HO) existe sous trois isoformes. L'expression, la distribution et la régulation de HO-1, -2 et -3 diffèrent selon les cellules et les tissus. Seules les HO-1 et -2,

produits respectifs des gènes *ho-1* et *ho-2*, ont une activité catalytique notable pour l'hème. Les fonctions de l'HO-3 ne sont pas encore clairement identifiées.

L'expression de l'HO-2 est constitutive, en particulier au sein des cellules du système nerveux central⁴⁷⁴. A l'inverse, l'HO-1 est strictement inductible. Son expression intracellulaire, à la membrane du système réticulo-endoplasmique, est ubiquitaire et induite par de nombreux stimuli parmi lesquels le stress oxydatif, ainsi que par la liaison des complexes hémoglobine-haptoglobine et hématine-hémopexine à leurs récepteurs spécifiques⁴⁷⁵. L'augmentation rapide et importante de l'HO-1 après stimulation cellulaire constitue l'une des caractéristiques de cette enzyme, dont la synthèse est régulée via de nombreux facteurs transcriptionnels et circuits de signalisation⁴⁷⁶.

2.2 Toxicité induite par l'hémoglobine libre et ses dérivés

Hémoglobine libre et hématine, de par leurs propriétés biochimiques et structurales, ont de multiples effets sur l'endothélium, qui constitue leur principale cible, ainsi que sur certains tissus, en particulier rénal. Ces effets sont généralement décrits comme dépendant de la concentration et du temps d'exposition, traduction possible des différences phénotypiques observées entre les tableaux d'hémolyse aiguë et chronique. Ces molécules conduisent notamment, via divers mécanismes, à l'acquisition d'un phénotype vasculaire prothrombotique et proinflammatoire. Les principaux mécanismes de toxicité de l'hémolyse intravasculaire sont résumés dans la figure n°21, p.103.

2.2.1 Principaux mécanismes de toxicité de l'Hb libre et de ses dérivés

2.2.1.1 Déplétion en monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un acteur essentiel de l'homéostasie vasculaire. Il constitue l'un des principaux médiateurs de la vasodilatation endothéliale^{477,478}, mais est également impliqué dans la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, l'adhérence leucocytaire et, comme nous le verrons secondairement dans l'hémostase. Sa synthèse

endothéliale, est sous la dépendance de la NOS endothéliale (eNOS), enzyme constitutive, qui catalyse, en présence de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), l'oxydation de la L-arginine en NO et L-citrulline. La eNOS peut être activée via différents mécanismes : d'une part, par une voie calcium-dépendante, où l'augmentation des taux intracellulaires de Ca^{2+} sous l'effet de divers médiateurs (acétylcholine, bradykinine), libère la eNOS de sa liaison inhibitrice à la cavéoline ; d'autre part, par des voies de phosphorylation (PI3K/Akt), notamment régulées par les forces de cisaillement, le VEGF et les œstrogènes^{479,480}. Le NO, très diffusible, rejoint ensuite, à travers les membranes cellulaires, la lumière vasculaire et les cellules musculaires lisses, dont il induit la relaxation par augmentation des taux intracellulaires de GMPc (guanosine monophosphate cyclique)⁴⁷⁸.

L'hémolyse intravasculaire induit une rapide déplétion en NO, via deux mécanismes :

- d'une part, principalement, par un mécanisme de consommation, via les réactions du NO avec l'oxy et la desoxy-hémoglobine, à l'origine notamment de ferri-Hb ;
- d'autre part, par un mécanisme d'inhibition de synthèse. En effet, l'hémolyse s'accompagne d'une libération d'arginases érythrocytaires, qui convertissent la L-arginine, nécessaire à la synthèse de NO, en ornithine.

Le NO produit par les cellules endothéliales est ainsi immédiatement capté par l'Hb libre, ce qui inhibe sa diffusion paracrine vers les cellules musculaires lisses vasculaires⁴⁸¹ et altère la vasomotricité^{482,483}. De nombreux travaux ont étudié les conséquences de l'hémolyse sur le tonus vasculaire. Ils ont montré que, par l'intermédiaire notamment de la déplétion en NO, survenait une vasoconstriction pouvant donner lieu à une hypertension artérielle systémique ou pulmonaire ainsi qu'à une altération de la perfusion des organes⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁶. Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition des interactions NO/Hb libre, par mutagénèse dirigée de l'hémoglobine chez des rats, s'accompagnait d'une diminution des phénomènes de vasoconstriction et d'hypertension artérielle observés après perfusion d'hémoglobine libre⁴⁸⁷.

2.2.1.2 Extravasation de l'hémoglobine libre

Sous forme dimérique, l'hémoglobine libre, compte tenu notamment de son petit poids moléculaire (32kDa), est capable de traverser l'endothélium vers l'espace sous-endothélial et péri-vasculaire⁴⁸⁸, ce qui participe à sa toxicité. En effet, l'espace interstitiel constitue probablement l'un des sites de la captation par l'Hb du NO d'origine endothéliale. Plusieurs équipes ont ainsi montré une diminution de l'effet vasoactif de l'Hb libre lorsqu'elle est polymérisée et donc de plus haut poids moléculaire, ce qui entrave sa translocation à travers l'endothélium⁴⁸⁹. D'ailleurs, l'un des mécanismes protecteurs de la liaison de l'Hb à l'haptoglobine tient à la formation d'un complexe de haut poids moléculaire (>150 kDa), qui reste donc intravasculaire⁴⁹⁰.

2.2.1.3 Induction de stress oxydatif et transduction de signaux intracellulaires

L'oxydation de l'hémoglobine génère des dérivés porteurs de groupement ferrique (Fe^{3+}) ou ferryl (Fe^{4+}) ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont les propriétés pro-oxydantes sont susceptibles d'altérer de nombreux composants plasmatiques, membranaires ou intracellulaires.

Ils peuvent ainsi altérer, par oxydation, l'ADN⁴⁹¹ ainsi que les protéines, dont ils favorisent également la réticulation⁴⁵². D'autre part, ils peuvent induire une peroxydation lipidique. L'hématine a notamment une forte affinité pour les lipoprotéines, en particulier les LDL, qui oxydés recrutent des macrophages, susceptibles de léser l'endothélium et de favoriser, en cas d'hémolyse chronique, le développement d'athérosclérose^{492,493}.

Par l'intermédiaire de l'oxydation des lipides ou protéines membranaires ou par action directe des ROS, qui interagissent avec différents récepteurs ou facteurs de transcription, l'hémolyse conduit à la transduction de nombreux signaux intracellulaires, notamment proinflammatoires.

Les ROS peuvent, en effet, activer les voies de signalisation NF- κ B et AP-1^{494,495}. L'hématine peut également se lier aux TLRs (Toll Like Receptors), en particulier le TLR-4⁴⁹⁶, susceptible d'activer ainsi la voie NF- κ B. Par ailleurs, l'hème, en se liant à Bach 1, un répresseur transcriptionnel qui régule l'expression de l'HO-1 et d'autres enzymes anti-oxydantes, abroge ces fonctions répressives⁴⁹⁷.

2.2.1.4 Amplification de l'hémolyse

De par sa nature hydrophobe, l'hématine peut s'intercaler au sein des membranes cellulaires riches en lipides, augmentant ainsi leur susceptibilité à être lésée via des mécanismes d'oxydation^{452,498}.

Elle peut ainsi affecter les membranes érythrocytaires et participer à amplifier l'hémolyse. D'une part, il a été montré que la ferrihémoglobine, indépendamment de l'action éventuelle des radicaux libres, induit une incapacité des globules rouges à maintenir leurs gradients électrochimiques, du fait notamment d'une fuite potassique, pouvant conduire à une lyse osmotique⁴⁹⁹. D'autre part, l'hématine peut altérer la conformation des protéines du cytosquelette érythrocytaire, telles que la spectrine et la protéine 4.1. Cela diminue la stabilité structurelle de ces cellules^{500,501}. Les érythrocytes sont d'autant plus sensibles à l'action hémolytique de l'hématine qu'ils sont pathologiques ou sénescents⁴⁵².

2.2.2 Propriétés prothrombotiques

Plusieurs constats permettent de suggérer un rôle prothrombotique fort de l'hémoglobine libre et de ses dérivés. D'une part, les complications thrombotiques émaillent fréquemment l'évolution de certaines pathologies caractérisées par une anémie hémolytique, en particulier la drépanocytose⁵⁰², les thalassémies⁵⁰³ ou l'hémoglobinurie paroxystique nocturne⁵⁰⁴. D'autre part, il a été rapporté, après administration intraveineuse d'hématine chez des volontaires sains, un allongement des temps de prothrombine et de thrombine, associé à la survenue de thrombophlébite dans 45% des cas (4/9 patients)⁵⁰⁵. Ce type de complication est également décrit chez des patients souffrant de porphyrie aigue intermittente traitée par perfusion d'hématine^{506,507}. De nombreux travaux tendent à confirmer cet effet prothrombotique de la ferri-hémoglobine et de l'hématine, via des mécanismes intéressant aussi bien l'hémostase primaire que la coagulation.

Effets sur l'hémostase primaire

En premier lieu, ces molécules induisent une activation plaquettaire. Olsen et al ont montré in vivo sur modèle animal (rat), que la perfusion d'hémoglobine s'accompagnait d'une augmentation de l'adhérence et de l'agrégation plaquettaire sur les surfaces vasculaires lésées⁵⁰⁸. Le principal mécanisme évoqué est celui de la déplétion en NO induite par l'Hb libre. En effet, le NO est connu pour être un inhibiteur de l'activation plaquettaire, via notamment une augmentation des taux de GMPc⁵⁰⁹. Par ailleurs, Studt et al ont montré que l'activité ADAMTS-13 était inhibée, de façon dose-dépendante, par l'hémoglobine libre et ce dès une concentration de 0,2g/L⁵¹⁰, mécanisme susceptible d'accentuer la formation de thrombi.

Effet sur la coagulation

In vitro, en présence de plasma humain normal, l'hématine active la voie endogène, FXII-dépendante, de la coagulation et génère également une activité kallikréine, qui pourrait encore amplifier l'auto-activation du FXII⁵¹¹. D'autre part, elle interviendrait sur la voie exogène de la coagulation, en provoquant une augmentation de la synthèse et de l'expression membranaire du facteur tissulaire⁵¹².

La déplétion en NO joue ici aussi un rôle important. En effet, le NO interagit avec certains acteurs de la cascade de la coagulation et notamment le FXII, qu'il inhibe. C'est l'un des mécanismes retenus pour expliquer l'augmentation de la stabilité du clou plaquettaire en cas de déplétion en NO⁵¹³. Par ailleurs, il a été montré que l'inhibition de la production endothéliale de NO exacerbe les lésions rénales observées dans un modèle de SHU induit par injection artérielle rénale d'anticorps anti-cellules endothéliales glomérulaires chez le rat^{514,515}. Shao et al. observent, chez ces rats, une augmentation notable des dépôts glomérulaires de fibrine ainsi qu'un nombre plus important de cellules endothéliales apoptotiques⁵¹⁵. Enfin, des lésions rénales de MAT ont été observées dans un modèle murin déficitaire en NO⁵¹⁶.

Notons que les microparticules érythrocytaires issues de l'hémolyse contribuent également à l'augmentation de la génération de thrombine^{517,518}.

Figure n°21 : Principales conséquences de l'hémolyse intravasculaire (adaptée de Rother et al, JAMA, 2005)⁵²⁵

2.2.3 Propriétés proinflammatoires

L'hémoglobine libre et ses dérivés ont également des propriétés proinflammatoires, en provoquant une augmentation de la perméabilité vasculaire⁵¹⁹ et en favorisant le recrutement et l'adhérence des cellules inflammatoires.

Il a notamment été montré, sous l'effet de ferrihémoglobine ou d'hématine :

- Une rétraction cellulaire endothéliale⁵²⁰, ce qui pourrait participer à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à l'exposition de la matrice sous-endothéliale ;
- Une augmentation de l'expression endothéliale de certaines molécules d'adhérence telles que ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1), E-selectine ou fibronectine ; l'expression membranaire de P-selectine est également augmentée, de façon transitoire^{521,522} ;
- Une activation des polynucléaires neutrophiles : d'une part, leur chimiotactisme est augmenté, via probablement la production d'IL8 induite dès de faibles doses d'hématine (3 μ M); d'autre part, l'hématine déclenche une polymérisation de l'actine des neutrophiles, participant ainsi à leur adhérence stable à l'endothélium, qui est suivie de leur dégranulation et d'une libération dose-dépendante de dérivés oxygénés⁵²³ ;
- Une augmentation de l'expression des récepteurs à IL-2 sur les cellules mononucléées circulantes⁵²⁴.

2.2.4 Toxicité rénale de l'hémolyse

Le rein devient, en cas d'hémolyse massive, l'un des principaux sites de clairance et de dégradation de l'hémoglobine libre. L'hémoglobine dimérique, filtrée par les glomérules, est internalisée par les cellules épithéliales des tubes contournés proximaux, via deux récepteurs présents au pôle apical de ces cellules, la cubiline et la megaline⁵²⁶. L'hème, issu de la dissociation intracellulaire de l'hémoglobine, est alors pris en charge par l'HO-1, dont la synthèse (pic d'ARNm \approx 12h) est fortement induite au sein des cellules épithéliales tubulaires en cas de stress oxydatif⁵²⁷. Lorsque les capacités de résorption de ces cellules sont dépassées, une hémoglobinurie apparaît.

La susceptibilité rénale à l'hémolyse est depuis longtemps décrite, via notamment des modèles animaux d'insuffisance rénale aigue expérimentale après perfusion de solutions d'hémoglobine ou de méthémoglobine^{528,529}. Traditionnellement, la toxicité rénale aigue de l'hème est rattachée à trois mécanismes physiopathologiques^{451,530} : i/ une hypo-perfusion rénale rapportée à des phénomènes de vasoconstriction, notamment liés à la déplétion en NO ; ii/ une obstruction tubulaire par précipitation intra-tubulaire de l'hémoglobine ; iii/ une cytotoxicité directe de l'hème sur les cellules épithéliales tubulaires, participant ainsi à leur apoptose et à leur détachement.

L'analyse histologique rapporte, de fait, des atteintes principalement tubulaires associant classiquement une hémosidérose tubulaire proximale, la présence de précipité d'Hb intra-tubulaire et des lésions de nécrose tubulaire aigue, tandis que les autres segments du néphron, lorsqu'ils sont décrits, restent subnormaux⁵³¹. Ces lésions tubulaires sont exacerbées, après induction d'une hémolyse, dans des modèles animaux où ont été invalidés certains systèmes de détoxification de l'hème, tels que l'hémopexine⁵³² ou l'HO-1⁵³³. Là encore, il n'est pas décrit de lésions intéressant les autres segments néphroniques. L'exposition chronique à l'hème, étudiée dans un modèle de rat soumis à des hémolyses itératives induites par glycérol, contribue, en revanche, au développement de lésions interstitielles, avec infiltrat inflammatoire puis fibrose, probablement par l'intermédiaire des facteurs MCP-1 et TGF β , dont les synthèses sont augmentées dans ces conditions^{534,535}.

Dans ces modèles animaux exposés à une hémolyse induite, à des perfusions d'hémoglobine ou hématine ou à une défaillance des systèmes de détoxification, il n'est pas fait notion de lésions micro-vasculaires. Ces données suggèrent que le potentiel prothrombotique de l'hémoglobine libre et de ses dérivés s'exprime plus particulièrement sur un endothélium pathologique.

2.3 Maladies hémolytiques et activation du complément

L'activation du complément est depuis longtemps décrite dans d'autres pathologies hémolytiques que le SHU ou le PTT. Ceci, même en dehors du contexte des anémies hémolytiques auto-immunes ou hémolyses post-transfusionnelles, où l'activation du complément, par la voie classique, est anticorps-dépendante⁵³⁶. Une activation est notamment rapportée : dans la β thalassémie majeure, où une augmentation du clivage du C3 et du FB a été mise en évidence⁵³⁷ ; dans la drépanocytose où une activation de la voie alterne a été décrite, principalement en période de crise^{115,538} mais également chez des patients asymptomatiques⁵³⁹ ; dans la malaria où une activation des voies classique^{540,541} et alterne^{542,543} est observée.

Parmi les mécanismes évoqués, Wang et al suggèrent que la surface des drépanocytes, marquée par une distribution en phospholipides membranaires anormale, constitue une surface activatrice de la voie alterne¹¹⁵. Dans la malaria, l'activation de la voie classique est supposée secondaire à la formation de complexes immuns chez les patients⁵⁴⁴, tandis qu'il existe également une activation de la voie alterne, qui coïncide avec la rupture des schizontes⁵⁴⁵. Outre ces quelques données, les mécanismes de l'activation du complément dans les pathologies hémolytiques ont été assez peu étudiés.

Certaines équipes se sont néanmoins interrogées sur le rôle direct de l'hémoglobine et de ses dérivés. Il a ainsi été montré, in vitro, que l'adjonction de solutions d'hémoglobines (préparées à partir de lysat d'érythrocytes issus de patients sains ou drépanocytaires) à du sérum humain déclenchait une activation de la voie alterne du complément, révélée par la présence de produits de clivage du C3 et du FB persistante en cas d'inhibition de la voie classique (Mg^{2+} -EGTA)⁵³⁹. Dans ce travail décrit en 1978, Wilson et al soulevaient déjà le rôle possible du complément dans la genèse du phénotype endothélial prothrombotique observé dans les hémolyses intravasculaires aiguës. Ces résultats ont été remis en question, compte tenu de l'emploi, en conditions expérimentales, de solutions d'hémoglobine possiblement contaminées. Or, il a été montré que l'hémoglobine potentialisait la capacité des endotoxines bactériennes à activer la coagulation⁵⁴⁶ et il a été suggéré qu'il pouvait en être de même pour l'activation du complément⁵⁴⁷.

Ces résultats ont, cependant, été finalement confirmés avec des protéines purifiées. D'une part, Smith et al rapportent, en 1992, à travers l'étude des effets pro-coagulants de l'hémoglobine et de ses dérivés, une augmentation de la libération de C3a dans le plasma in vitro⁵⁴⁸. D'autre part, Pawluczko et al, en 2007, décrivent une activation de la voie alterne en phase fluide sous l'effet de l'hématine. Cette activation s'accompagne du dépôt de fragments de C3 (C3b, iC3b, C3dg) à la surface des érythrocytes, en partie via le récepteur CR1, favorisant ainsi leur clairance par le système phagocytaire⁵⁴⁹. Ils rapportent donc un nouveau mécanisme pouvant expliquer l'amplification de l'hémolyse par l'hémoglobine libre et ses dérivés. A l'inverse, il a été montré que l'hème inhibait l'activation de la voie classique. En effet, Roumenina et al ont montré que l'hème liait le C1q, altérant ainsi ses capacités de reconnaissance vis-à-vis de la CRP ou des IgG⁵⁵⁰ et donc le déclenchement de la voie classique.

Compte tenu des propriétés prothrombotiques et proinflammatoires de l'hémoglobine et de ses dérivés sur l'endothélium et dans la mesure où la littérature suggère une activation de la voie alterne par l'hématine, nous avons émis l'hypothèse d'un rôle direct de l'hémolyse dans la physiopathologie des MAT et tout particulièrement dans les SHU dépendant du complément.

Les études préalables sur la contribution de l'hème à la physiopathologie des SHU ou autres MAT sont pauvres. Il existe un travail, décrit par Bitzan et al, qui montre que la vérotoxine potentialise la cytotoxicité de l'hème envers les cellules épithéliales tubulaires (lignée), ainsi qu'envers des cellules endothéliales microvasculaires (culture primaire de cellules endothéliales du derme). En effet, le prétraitement de ces cellules par des doses subléthales de vérotoxine, induit, après exposition à de l'hématine, une augmentation de leur détachement⁵⁵¹.

2.4 Thérapeutiques ciblées sur l'hémolyse dans les MAT ?

L'un des objectifs visés, en s'intéressant au rôle de l'hémolyse dans les SHU atypiques, est de dégager potentiellement une nouvelle cible thérapeutique.

Bien entendu, l'hémolyse reste un élément consécutif et non étiologique de la MAT. Néanmoins, bloquer ses effets pourrait limiter l'amplification des phénomènes prothrombotiques.

Cibler l'hémolyse a déjà été envisagé dans d'autres pathologies hémolytiques, et notamment via l'utilisation d'haptoglobine ou d'hémopexine purifiées^{490,552}.

Récemment, Vinchi et al ont montré, dans un modèle in vitro de cellules endothéliales (HUVEC) exposées à l'hématine ainsi que dans deux modèles murins de β thalassémie et de drépanocytose, que l'adjonction d'hémopexine s'associait à une diminution de l'expression endothéliale de molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1, E-selectine), à une diminution de la production de ROS et à une augmentation de la biodisponibilité de NO⁵⁵³. Actuellement, il n'y a pas d'expérience clinique de l'utilisation d'hémopexine.

Plusieurs équipes ont, par ailleurs, montré sur modèles animaux que l'administration d'haptoglobine diminuait les effets toxiques de l'hémoglobémie. La co-injection d'hémoglobine et d'haptoglobine, dans un modèle de cobaye, permet de limiter l'hypertension artérielle, le stress oxydatif, l'hémoglobinurie et l'insuffisance rénale^{554,555}. Boretti décrit également un effet bénéfique d'un prétraitement par glucocorticoïdes (8mg/kg/jours en deux prises pendant 3 jours) chez des chiens secondairement traités par perfusions d'hémoglobine, via une augmentation notable du taux d'haptoglobine circulant sous l'effet de ce prétraitement. Enfin, des résultats similaires ont été observés dans un modèle de cobayes exposés à des transfusions d'érythrocytes sénescents, qui, en l'absence de co-traitement par haptoglobine purifiée, développent de façon aigüe (à 24h) un tableau associant hémolyse intravasculaire, hypertension artérielle, lésions vasculaires (nécrose/coagulation), hémoglobinurie et insuffisance rénale aigüe⁵⁵⁶.

L'haptoglobine purifiée est disponible au Japon depuis 1985 et plusieurs travaux cliniques de petite taille ou « case report » suggèrent l'intérêt de ce traitement dans la prévention de l'insuffisance rénale aigüe⁴⁹⁰, notamment en chirurgie cardiaque en cas de circulation extracorporelle⁵⁵⁷.

D'autres voies thérapeutiques sont étudiées, visant plus spécifiquement :

- à augmenter la biodisponibilité du NO : Kaul et al ont montré, dans un modèle murin drépanocytaire (BERK), que l'administration d'arginine chez ces souris diminuait

l'hémolyse, le stress oxydatif et augmentait la biodisponibilité du NO⁵⁵⁸ ; sur un autre modèle murin de drépanocytose (souris Hbb^s/ Hbb^s), un effet bénéfique sur la vasoconstriction vasculaire pulmonaire et sur l'inflammation bronchique a été observé sous l'effet de NO inhalé⁵⁵⁹.

- à augmenter l'expression de HO-1 : Belcher et al ont mis au point l'utilisation, dans un modèle murin drépanocytaire, d'une thérapie génique ciblée *hmox-1* par transposon, conduisant à augmenter l'expression hépatique de HO-1. Ils montrent, chez ces souris exposées à une hypoxie/réoxygénation, une diminution de certaines voies de signalisation proinflammatoires (MAPK, NF-κB), de l'expression de molécules d'adhérence (VCAM-1) et de la stase vasculaire dans les veinules sous-cutanées⁵⁶⁰.

Ainsi, l'activation endothéliale aiguë constitue un mécanisme phare par lequel agisse, notamment, la majorité des facteurs étiologiques connus de SHU. L'existence sous-jacente d'une défaillance de la régulation des systèmes de l'inflammation ou de l'hémostase est alors susceptible de rompre l'équilibre de l'homéostasie endothéliale et de conduire au développement des lésions de microangiopathie thrombotique. Si l'activation endothéliale initie ce déséquilibre, il apparaît que l'hémolyse pourrait venir l'amplifier, de par ses propriétés proinflammatoires et prothrombotiques. Elle pourrait constituer une seconde source d'agression de l'endothélium, susceptible d'induire le dépassement de ses capacités de tolérance et participer ainsi à majorer l'expression clinique des différents syndromes de microangiopathies thrombotiques.

Partie 2

Présentation des travaux

Chapitre 1 : Etude centrée sur la mutation C3_{R139W}
Caractérisation fonctionnelle de la mutation et caractéristiques
phénotypiques des SHUa associés

Article 1



Objectifs principaux

La première partie de mon travail s'est concentrée sur l'étude de la mutation C3_{R139W}. Il s'agit d'une mutation hétérozygote portée par l'exon 4 du C3, caractérisée par la substitution en position 481 d'une cytosine par une thymine (481C>T). Cette substitution conduit au remplacement d'un résidu arginine par un résidu tryptophane, en position 139 de la protéine C3 mature (absence du peptide signal de 22 résidus), au sein de son deuxième domaine macroglobuline (MG2).

L'intérêt porté à cette mutation s'explique principalement par sa prévalence puisqu'elle a été identifiée, de façon sporadique, chez 14 patients avec un SHUa, ce qui représente environ 4% de la cohorte française des SHUa et environ la moitié des patients porteurs d'une mutation dans le gène du C3. Communément, les SHUa sont rattachés à une mutation ponctuelle rare concernant l'une des protéines activatrices ou régulatrices du complément et le petit nombre de patients partageant la même mutation complique

l'analyse de leurs conséquences propres et des facteurs additionnels influençant la pénétrance et l'expression de la pathologie.

Ainsi, les objectifs de ce travail étaient de réaliser la caractérisation phénotypique des SHUa présentés par ces patients, de déterminer d'éventuels facteurs susceptibles d'influencer l'expression de la pathologie et d'étudier les caractéristiques fonctionnelles de ce C3 muté ainsi que ses conséquences sur l'endothélium.

Résultats

La mutation C3_{R139W} a donc été identifiée chez 14 patients ainsi que chez 11 des 19 apparentés sains chez qui une étude génétique a pu être réalisée. La présence de polymorphisme de susceptibilité au SHUa, dans les gènes du FH (FH gtgt) ou de MCP (MCP ggaac), était significativement plus fréquente chez les patients qu'au sein d'une population témoin ou que parmi les apparentés sains porteurs de la mutation. Ces résultats ont conforté le caractère multigénique du SHUa et l'influence des polymorphismes à risque dans sa pénétrance.

L'étude de l'expression phénotypique des SHU a révélé une distribution hétérogène, l'âge de survenue de la pathologie variant entre 8 mois et 72 ans (médiane : 22 ans). Elle a confirmé une apparente susceptibilité du sexe féminin à l'âge adulte (8/9 patients adultes) ainsi que la fréquente identification de facteurs déclenchant (10/14). L'évolution fonctionnelle rénale était souvent sévère, puisque six patients évoluaient vers l'insuffisance rénale chronique terminale dans la première année et il persistait, dans les autres cas, une insuffisance rénale chronique séquellaire. Par ailleurs, sur les 7 transplantations rénales réalisées, 4 étaient marquées par une récurrence de SHUa, conduisant dans tous les cas, à une perte fonctionnelle du greffon. Nous avons, d'autre part, identifié une fréquence non négligeable d'événements neurologiques (5/14) ainsi que cardiologiques (8/14), suggérant notamment l'intérêt d'évaluer initialement et de surveiller la fonction cardiaque chez les patients (dosage des troponines, échocardiographie). Enfin, le taux plasmatique de C3 était abaissé en phase aiguë du SHU chez 6/9 patients ainsi qu'en dehors de tout épisode chez 5/8 patients, alors qu'il était constamment normal chez les apparentés sains (8/8).

L'étude des conséquences endothéliales de la mutation C3_{R139W}, en termes d'activation du complément et d'acquisition d'un phénotype procoagulant, a été réalisée, à partir de

sérum de patients, sur deux modèles cellulaires endothéliaux : d'une part, sur des HUVEC isolées dans le laboratoire selon la méthode de Jaffe⁵⁶¹ et d'autre, sur des GEnC (glomerular endothelial cells), lignée immortalisée de cellules endothéliales glomérulaires humaines⁵⁶², obtenue gracieusement auprès des Dr. Satchell et Pr. Mathieson.

Sur cellules natives, il n'existait pas, en cytométrie de flux, de différence significative du dépôt membranaire de C3 entre sérums-contrôles et sérums-patients. A l'inverse, nous avons montré, sous l'effet d'une pré-activation endothéliale par des cytokines inflammatoires, une augmentation de ce dépôt et ce de façon significativement plus marquée avec les sérums-patients et ceux des apparentés sains porteurs de la mutation qu'avec les sérums-contrôles. Dans ces mêmes conditions d'activation endothéliale, nous avons mis en évidence une élévation des taux de C3a, C5a et C5b-9 soluble libérés lors de l'incubation des cellules endothéliales en présence de sérums porteurs de la mutation ainsi qu'une augmentation de l'expression membranaire de facteur tissulaire. Comme dans le cas du dépôt de C3, nous n'avons pas observé, pour ces paramètres, de différence significative entre témoins et patients en l'absence de pré-activation cellulaire. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle le SHUa serait provoqué par l'amplification par un complément mal régulé, d'un événement lésionnel initial touchant les cellules endothéliales. Ils sont, par ailleurs, concordants avec les données cliniques, qui suggèrent que l'expression de la pathologie chez les sujets porteurs de la mutation C3_{R139W}, requiert des facteurs additifs (facteurs déclenchant : 10/14 ; polymorphismes à risque : 7/14).

Par ailleurs, nous avons montré, sur cellules activées, qu'en cas d'inhibition du FH, par addition d'anticorps bloquants lors de l'étape d'incubation avec le sérum de patient, le dépôt de C3 était supérieur qu'en cas d'inhibition de MCP (anticorps bloquant), suggérant que la mutation C3_{R139W} soit majoritairement régulée par le FH. Pour appuyer cette hypothèse, nous avons établi que l'addition de FH purifié au sérum de patient s'accompagnait d'une diminution dose-dépendante du dépôt membranaire de C3.

La caractérisation fonctionnelle de la mutation C3_{R139W} a été réalisée à partir de protéines recombinantes. Cette mutation est localisée à proximité des sites de fixation du FH, de MCP et du FB. La liaison de ces trois protéines avec le C3_{R139W} recombinant a été étudiée par ELISA et SPR (surface plasmon resonance).

En premier lieu, nous avons observé une diminution de la liaison de MCP avec le C3_{R139W}, tandis que l'interaction avec le FH était, elle, comparable à celle de la protéine témoin. Ceci est concordant avec les données précédemment décrites, qui suggèrent un rôle particulièrement important du FH chez les patients porteurs de la mutation C3_{R139W}.

D'autre part, nous avons mis en évidence une augmentation nette de la liaison de la protéine C3_{R139W} avec le FB, qui s'est avérée associée à la formation d'une C3 convertase plus efficace (analyse par SPR).

Nous avons ainsi démontré que la mutation C3_{R139W} modifiait les caractéristiques fonctionnelles de la protéine C3, induisant un gain de fonction, à la fois, direct par augmentation de l'affinité avec le FB, et indirect par réduction de l'interaction avec la MCP.

Conclusion

- La mutation C3_{R139W} constitue un facteur de susceptibilité au SHUa, comme le suggère son identification chez 14 patients non apparentés (4% de la cohorte française).
- Sa caractérisation fonctionnelle a mis en évidence un gain de fonction, à la fois direct et indirect, de la protéine C3.
- Elle induit, en cas d'activation endothéliale préalable, une activation du complément à la surface des cellules endothéliales, ainsi que l'acquisition d'un phénotype procoagulant en favorisant l'expression membranaire de facteur tissulaire.
- La pénétrance du SHU chez les sujets porteurs de la mutation C3_{R139W} semble modulée par l'existence concomitante de polymorphismes à risque (FHgtgt, MCPggaac) ou l'exposition à des facteurs environnementaux agressant l'endothélium.
- L'expression clinique des SHU-C3_{R139W} est notamment marquée par une fréquence importante d'évènements cardiologiques, rappelant l'intérêt de surveiller la fonction cardiaque au cours de cette pathologie.



Roumenina Blood 2012.pdf

Supplementary Patients, Materials and Methods

Patients

Definitions

HUS relapse was defined as recurrence of microangiopathic haemolytic anemia and/or thrombocytopenia, after these parameters had returned to the normal, with or without other extra-haematological manifestation.

Three grades of renal function were defined: end stage renal disease (ESRD), chronic kidney disease (CKD) not requiring chronic dialysis (glomerular filtration rate < 80 ml/min estimated by MDRD or Schwartz formula in children) and normal (glomerular filtration rate > 80 ml/min).

Case Report

Patient 1 (P1): This 6-month-old boy was admitted in intensive care unit due to an aHUS. In spite of a treatment by exchange-transfusion he developed a dilated cardiomyopathy and a chronic renal failure, which evolved to ESRD 11 years later. He experienced three kidney allografts. The first was marked by a chronic dysfunction and a graft loss after 9 years. The second allograft was lost after one month due to aHUS recurrence. The patient died of infectious complications associated with an acute rejection 2 months after the third transplantation.

Patient 2 (P2): This 10-month-old girl developed an aHUS with cardiogenic shock (shortening fraction: 15%) and encephalopathy with convulsions. She was treated by plasmatherapy. Outcomes were a dilated cardiomyopathy with a slow favourable evolution, an ESRD requiring hemodialysis 7 months later and secondary epilepsy. This patient had a hematologic recurrence after initiation of hemodialysis, which was resolved after binephrectomy.

Patient 3 (P3): This 14-month-old girl was hospitalized for an aHUS. The disease was marked by 4 relapses in 15 years, complicated by a chronic renal insufficiency. No extra-renal event has been reported. No plasmatherapy has been performed.

Patient 4 (P4): The first aHUS episode was diagnosed in retrospect for this 2-year-old boy. He suffered 6 relapses between the onset of the disease and the need of dialysis 35 years later. No extra-renal event has been described.

Patient 5 (P5): This patient was hospitalized at 15 years of age for an aHUS. The outcome was at first favourable under plasmatherapy. She experienced a relapse at 2 months, treated by plasmatherapy again. She developed a chronic renal insufficiency, which currently is at a pre-terminal stage after 22 years.

Patient 6 (P6): This woman was admitted to hospital for an aHUS at 18 years of age, associated with a transitory left brachiocephalic deficiency. The evolution was initially favourable under plasmatherapy, but was marked by two recurrences 2 and 4 months after the onset, leading to ESRD. Two transplantations failed due to recurrence of aHUS, the first after 23 months and the second after 11 months, in spite of preventive plasmatherapy.

Patient 7 (P7): This woman was hospitalized at 21 years of age for a postpartum aHUS following her first pregnancy. In spite of plasmatherapy, the kidney function deteriorated, reaching ESRD after 4 months. During the acute phase, she suffered convulsive seizures and cardiogenic shock (15% ejection fraction (Ef) leading to dilated cardiomyopathy. Neurologic and cardiologic evolutions were slowly favourable after several months. She was recently treated for a renal neoplasia, which contraindicated kidney transplantation.

Patient 8 (P8): This man developed aHUS at 21 years of age in a context of cocaine addiction. He was treated by plasmatherapy. The acute phase was marked by renal failure requiring haemodialysis and reaching rapidly ESRD, left heart failure leading to dilated cardiomyopathy (Ef: 45 %) and convulsions. Kidney transplantation was performed without aHUS relapse (5 years follow-up).

Patient 9 (P9): This 23-year-old woman was admitted for post partum aHUS, associated with a renal insufficiency requiring immediate hemodialysis. A hematological recurrence, associated with convulsions, was observed after 16 months in a context of malignant hypertension. The evolution was favourable under plasmatherapy.

Patient 10 (P10): This woman developed aHUS at 30 years of age. The disease was complicated by a chronic renal failure, in spite of the plasmatherapy. Two months after remission, she developed a cardiogenic shock (Ef: 10%), related to a dilated cardiomyopathy, whose evolution was slowly favourable.

Patient 11 (P11): This 34-year-old woman was hospitalized for an aHUS and was treated by plasmatherapy. The outcome was partially favourable, marked by the persistence of chronic renal failure (6 months follow-up).

Patient 12 (P12): This 35-year-old woman developed a post-partum aHUS following her third pregnancy. In spite of the plasmatherapy, the chronic renal failure persisted. Immediately after the aHUS onset, she developed a dilated cardiomyopathy and left heart failure (Ef: 30%).

Patient 13 (P13): This woman developed aHUS at 51 years of age, progressing to ESRD 12 months after the onset. No extra-renal event has been reported during the acute phase of HUS. She deceased after a heart attack with undetermined aetiology.

Patient 14 (P14): At 72 years of age, this woman became hemodialysis-dependent. The end-stage renal disease was initially related to nephroangiosclerosis but the diagnosis was corrected after the failure of renal transplantation caused by an aHUS. She was treated by plasmatherapy, but the evolution was unfavourable, leading to lost of allograft function 1 month after transplantation. During the acute phase, she suffered from left heart failure (Ef: 45%).

Methods

Complement assessment

Antigenic levels of C3 and FB were measured in EDTA-plasma by nephelometry. FH and FI levels and anti-FH auto-antibodies were assessed by specific ELISAs. MCP (CD46) expression was measured on granulocytes by flow cytometry.

Genetic analysis

Informed consent of patients or their legal guardians was obtained before DNA analysis. Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes of each patient. Coding sequences of *CFH*, *CFI*, *MCP*, *CFB* and *C3* were amplified with primers flanking all exons, purified using the Multiscreen® plates (Millipore, Molsheim, France), and sequenced with 96 capillary Sequencer 3730 using the dye terminator method (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). *CFHR1/3* deletion was searched by MLPA.

Endothelial cells assay

HUVECs were isolated from human umbilical cord veins. HUVECs were cultured in M199 medium (Gibco, Paisley, GB) with 20% fetal calf serum and 10% EGM-2/bullet kit medium (Lonza), containing VEGF. GEnCs were cultured in EGM-2 MV bullet kit medium for microvascular endothelial cells (Lonza). Third passage quiescent HUVECs cells were grown to confluence into 12-well gelatin-coated plates and quiescent GEnCs were grown in 24 wells plates. In each plate, half of the cells were activated overnight with TNF α and IFN γ . After washing off non adherent cells with warm PBS (37°C), adherent cells (GEnCs and HUVECs) were incubated with 1/3 dilutions, in M199 medium, of sera from R139W-aHUS patients, R139W healthy carriers, FH depleted serum (Comptech, Tylor, TX, USA) or normal human sera (from 50 individual donors). The level of complement activation was modulated using blocking anti-FH monoclonal antibody Ox24 (a kind gift from LFB, Les Ulis, France) or blocking anti-MCP GB24 mAb, added to cells together with the serum. After 30-minute incubation with serum at 37°C, the supernatant was recovered for C3a, C5a and sC5b9 measurements (MicroVue C3a, C5a and SC5b-9 Plus EIA Kit, Quidel, San Diego, USA) and the wells were washed three times with PBS. Adherent HUVECs and GEnCs were detached with PBS-5mM EDTA or with 5 mg/ml lidocaine 10mM EDTA, respectively. Cells were labeled with anti-C3c monoclonal antibody (Quidel, San Diego, CA, USA) or with a control mouse IgG1, followed by phycoerythrin (PE)-labeled secondary antibody (Beckman Coulter, Roissy, France). Alternatively, cells were labeled with anti-human Tissue factor-PE monoclonal antibody or Isotype-PE (BD Biosciences, San Jose, USA). Cells were analyzed by flow cytometry on a Becton Dickinson FacsCalibur (Mountain view, CA, USA), using CellQuest and FSC express software.

ELISA for recombinant C3 binding to FH and MCP

Microtitre wells were coated with 20 μ g/ml purified human FH (Comptech, Tylor, TX, USA) or MCP as in (4) in PBS, pH 7.4 for 1 h at 37°C. Residual binding sites were blocked with 2% BSA in PBS for 1 h at 37°C and washed with 10mM HEPES, 25mM NaCl, pH 7.4, containing 0.05% Tween20. Serial dilutions of the recombinant C3 proteins (culture supernatant or DEAE purified protein), in 4% BSA-containing HEPES buffer, pH 7.4, were incubated for 1h at 37°C. Following washing with HEPES buffer, wells were incubated with a chicken anti-human C3 polyclonal antibody (100ng/ml, Binding Site) for 1h at 37°C, followed by goat anti-chicken-HRP. Colour was developed using TMB substrate and OD₄₅₀ nm was measured. The background binding was subtracted.

ELISA for FB and FH binding to recombinant C3

In situ capturing of recombinant C3 on ELISA plates was achieved using monoclonal anti-C3d antibody (Quidel, San Diego, USA). The supernatant, containing recombinant proteins, was applied two times to assure saturation of the capturing antibody. After washing, purified human Factor B (Calbiochem, La Jolla, CA) was applied in 4% BSA HEPES buffer (as above) containing 5mM

MgCl₂. Alternatively, FH was applied in the same buffer but without MgCl₂. Bound FB or FH was revealed using polyclonal anti-FB or FH IgG, purified from antiserum (Calbiochem and Quidel for FB and FH respectively) and biotinylated according to Thermo-Scientific's instructions. Bound protein was revealed using Streptavidin-HRP (1:1000) conjugate and TMB substrate.

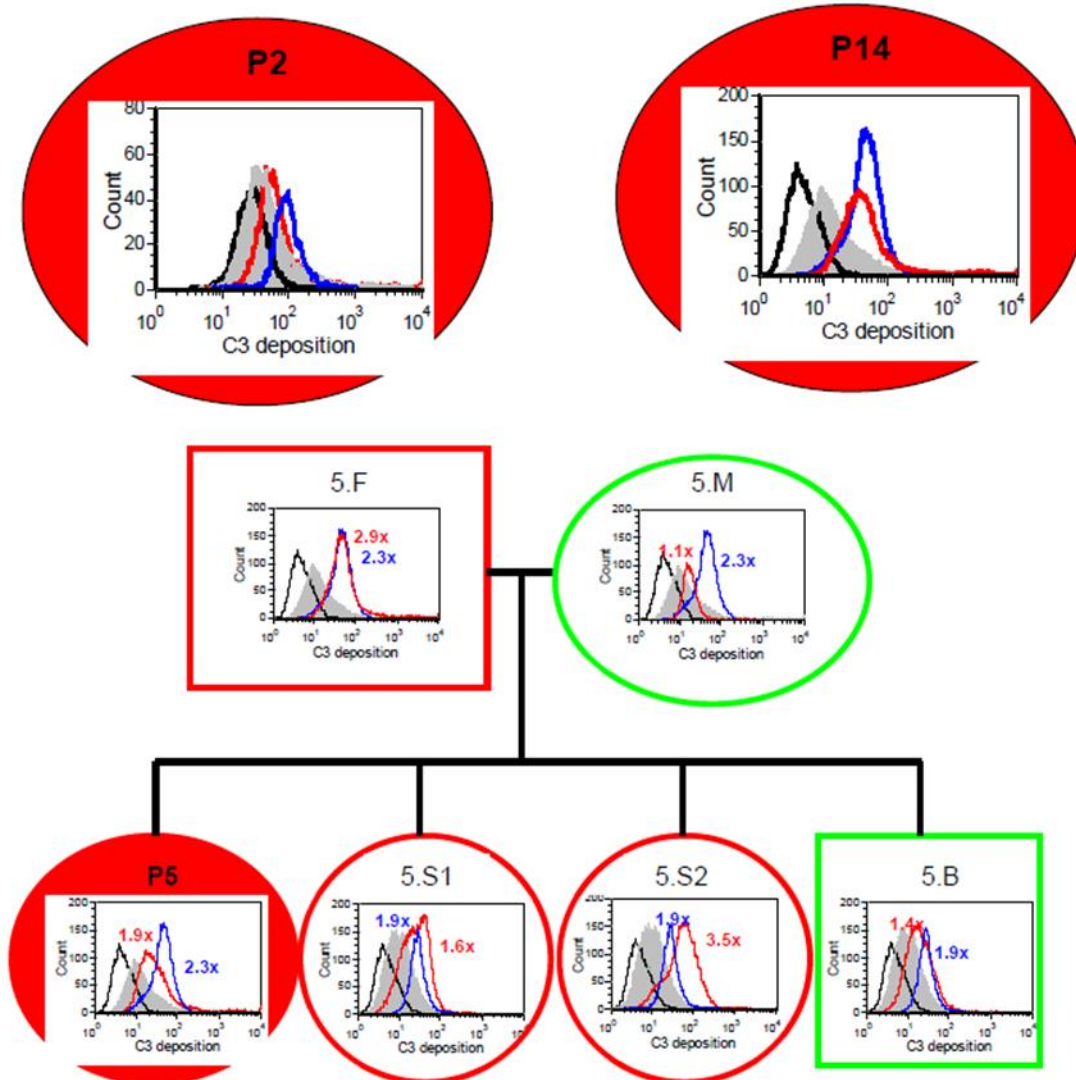
ELISA for decay acceleration of the C3 convertase by Factor H (supplementary Figure 2A)

In situ capturing of recombinant C3 on ELISA plates was achieved using monoclonal anti-C3d antibody (Quidel, San Diego, USA). The supernatant, containing recombinant proteins, was applied two times to assure saturation of the capturing antibody. After washing, purified human Factor B and Factor D (Calbiochem, La Jolla, CA) were applied in 4% BSA HEPES buffer (as above) containing 5mM MgCl₂. After 30 minutes the wells were washed and increasing concentrations of FH were added to the wells as indicated. Residual bound Bb was revealed using polyclonal anti-FB IgG, purified from antiserum (Calbiochem, La Jolla, CA) and biotinylated according to Thermo-Scientific's instructions. Bound protein was revealed using Streptavidin-HRP (1:1000) conjugate and TMB substrate.

Functional test for the cofactor activity of FH and MCP in the process of cleavage of C3 by FI (supplementary Figure 2B)

Recombinant C3 (WT or R139W) were incubated with Factor H (0.02 mg/ml) and Factor I (0.1 mg/ml) for 0, 5, 10, 20 and 40 minutes at 37°C and the cleavage of the α -chain of C3 and the appearance of the α 43 band were followed over time. At each time point 20 μ l of the reaction mixture were removed and for them the reaction was stopped by addition of 10 μ l reducing sample buffer and by heating for 10 minutes to 80°C. The samples were separated by SDS-PAGE electrophoresis using pre-cast 10% gels (Invitrogen) and transferred to a PVDF membrane. After blocking, the membrane was incubated with a polyclonal goat anti-C3 antibody 1/10000 (Calbiochem) and rabbit anti-goat IgG-HRP 1/10000 (Santa Cruz).

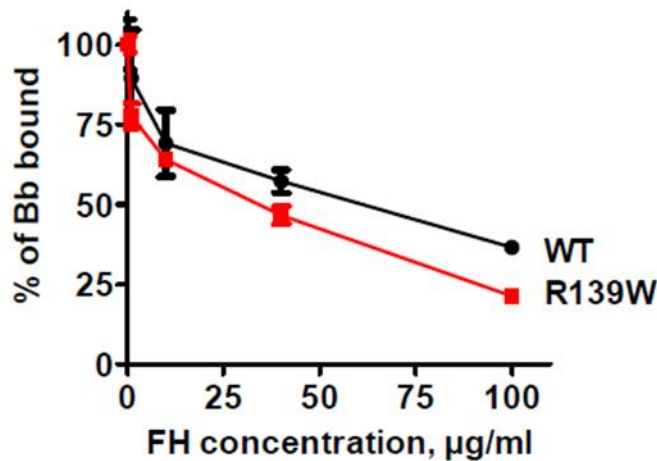
Supplementary Figure 1. **C3 deposition on activated HUVEC from R139W-aHUS patients sera and their healthy relatives**



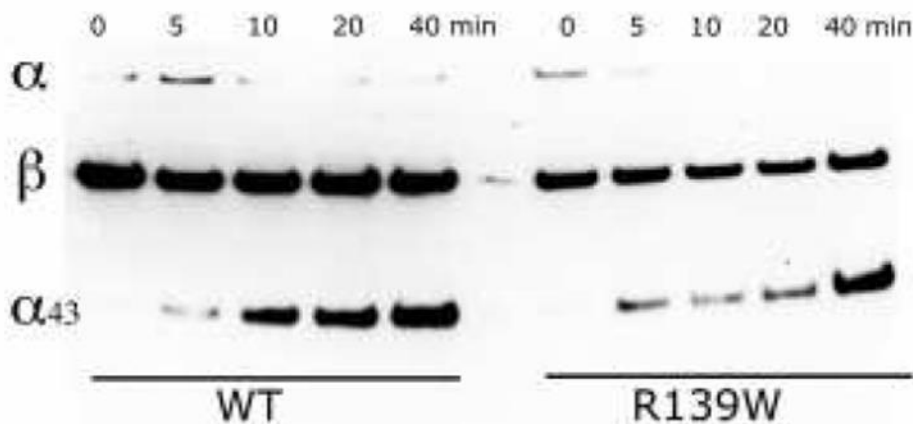
Supplementary figure 1. Relation of C3 deposition on activated HUVEC with the presence of R139W. Cells activated with TNF α /IFN γ HUVEC were incubated for 30 minutes with normal human sera, FHdpl or R139W positive sera, from patients P2 and P14 as well as from the members of the P5 family. Histograms from one representative flow cytometry experiment, out of at least 3 performed, are presented. In each genealogy tree the square means a male and the circle a female individual. Green contour is a mutation-free person; red contour is a healthy mutation carrier and the red background indicates an R139W-aHUS patient. The black histogram is the isotype control; the gray histogram represents the C3 deposition from 3 different normal donors; the blue histogram is the C3 deposition from FH depleted serum and the red histogram is from the subject. The fold increase of C3 deposition, as compared to the NHS, is given in each case.

Supplementary Figure 2. Functional activity of FH towards WT and R139W-C3.

A) C3 convertase decay by FH



B) Cofactor activity of FH



Supplementary figure 2. Functional activity of FH towards WT and R139W-C3. A) The decay acceleration activity of different concentrations of FH towards the C3 convertase C3bBb formed by WT or mutant C3 in the presence of FB and Factor D was measured by ELISA. B) The cofactor activity of FH towards WT or mutant C3 in the presence of Factor I was measured by a Cofactor test. Recombinant C3 (WT or R139W) was incubated with FH and Factor I for 0, 5, 10, 20 or 40 minutes at 37°C. The enzymatic reaction was stopped by adding reducing sample buffer and by heating the samples. The kinetic of cleavage of C3 to iC3b was revealed by western blot.

Chapitre 2 : Etude de l'activation du complément par l'hème et implication dans le syndrome hémolytique et urémique atypique

Article 2



Objectifs principaux

L'une des ambitions de ce projet de recherche était d'améliorer notre connaissance des mécanismes physiopathologiques et des facteurs de susceptibilité du SHUa, intrinsèques et environnementaux, dans le but d'une part de définir des sous-populations à plus haut de risque de récurrences et d'autre part d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, le SHUa est une pathologie multifactorielle dont l'expression est secondaire, dans un contexte sous-jacent de dysrégulation de la voie alterne du complément, à une agression endothéliale par divers facteurs. Ces derniers semblent, pour l'heure, non spécifiques (grossesse, infection, médicaments..) et leur exposition n'induit pas de façon systématique la survenue d'un SHU chez un même patient. Cela suggère l'intervention d'autres mécanismes susceptibles d'entraîner un dépassement des capacités de tolérance de l'endothélium et sa bascule vers un phénotype prothrombotique dérégulé.

L'hémolyse nous a semblé pouvoir être un candidat intéressant. En effet, indépendamment de la nature du facteur déclenchant initial, l'hémolyse constitue un dénominateur commun des SHU, ses dérivés ont un fort pouvoir prothrombotique et un travail préalable a

rapporté leur capacité à activer la voie alterne du complément en phase fluide⁵⁴⁹. Nous avons ainsi évoqué l'hypothèse que l'hème intervienne en deuxième ligne pour induire, via notamment une activation du complément, une amplification des processus prothrombotiques, susceptible de majorer les lésions de MAT et donc d'aggraver l'expression clinique du SHU.

Résultats

En premier lieu, nous avons confirmé que l'hème induisait une activation du complément en phase fluide, en mettant en évidence une augmentation dose-dépendante des taux de C3a, C5a et C5b-9 soluble, mesurés par ELISA, dans du sérum témoin exposé à des doses croissantes d'hème. Cette augmentation persistait en cas d'inhibition de la voie classique, mais à l'inverse n'était plus observée en sérum déplété en FB, en faveur d'une activation dépendante de la voie alterne.

Nous avons ensuite démontré qu'une telle activation survenait également sous l'effet de l'hème à la surface des cellules endothéliales (HUVEC et GEnC). Une augmentation dose-dépendante du dépôt membranaire de C3 était observée par trois techniques (cytométrie de flux, ELISA et Immunofluorescence) et persistait malgré le lavage des cellules entre les étapes d'exposition à l'hème et d'incubation avec le sérum, permettant d'éliminer un dépôt uniquement secondaire à une activation du complément en phase fluide par l'hème. Cette activation du complément à la surface des cellules était également dépendante de la voie alterne et s'accompagnait de la formation de CAM, traduisant la mise en œuvre de la voie terminale commune. Nous avons, par ailleurs, précisé la nature du C3 lié aux cellules et ainsi montré que l'hème induisait à la fois une fixation covalente de C3b et iC3b mais également une fixation de C3 non clivé, comme le suggère la liaison membranaire de l'anti-C3a. Notre hypothèse est que ce C3 non clivé corresponde à du C3(H₂O)-like, rappelant ici ce qui a été décrit à la surface des plaquettes activées ou des biomatériaux.

Dans le but de se rapprocher des conditions pathologiques du SHUa, le dépôt de C3 à la surface des cellules était étudié en présence de sérum de patients ayant présentés un SHUa et porteurs d'une mutation connue (FH ou C3). Les résultats étaient comparés à ceux de 30 sérums témoins. Ces expériences ont montré, sur cellules natives, un dépôt de C3 faible mais significativement supérieur en présence de sérums pathologiques, différence

exacerbée en cas d'exposition préalable des cellules à l'hème. Des résultats similaires étaient observés en conditions artificielles de dysrégulation du complément, mimant différentes conditions de susceptibilité au SHUa (FB recombinant porteur d'une mutation gain de fonction ; sérums déplétés en FH ou en FI ; anticorps anti-FH bloquant la région N- ou C-terminale).

Nous avons, dans un deuxième temps, étudié et identifié trois mécanismes par lesquels l'hème est susceptible d'activer la voie alterne du complément en phase fluide et/ou à la surface des cellules endothéliales :

1. Nous avons démontré, par SPR, que l'hème interagissait fortement et de façon dose-dépendante avec le C3 immobilisé (C3(H₂O)-like). Cette interaction est apparue majoritairement dépendante du fragment C3a. Les sites de liaison potentiels de l'hème au C3 ont été déterminés par docking moléculaire et localisés principalement dans le domaine ANA ou à proximité du pont thioester dans le domaine TED. Nous avons émis l'hypothèse que le groupement redox de l'hème pourrait favoriser l'hydrolyse du pont thioester et ainsi la transition du C3 natif vers sa forme hydrolysée. Le C3 hydrolysé est capable de former une C3 convertase alterne, ce qui pourrait expliquer l'activation du complément notamment observé en phase fluide. D'autre part, une augmentation des interactions homophiliques du C3, sous l'effet de l'hème, était suggérée en spectroscopie d'absorption et confirmée par SPR et chromatographie d'exclusion stérique. Ceci serait susceptible de favoriser la formation de C5 convertases. De façon cohérente, nous avons parallèlement observé, en SPR, à la surface de chip recouverts de C3, la formation de C3/C5 convertases de plus en plus efficace sous l'effet de doses croissantes d'hème. L'hème peut donc induire la formation d'hyper C3/C5 convertases, renforçant ainsi l'activation du complément.

2. Nous avons établi que l'hème induisait une diminution de l'expression membranaire de MCP et de DAF à la surface des cellules endothéliales (HUVEC), ce qui est susceptible de réduire les capacités de régulation du complément à la surface de ces cellules. Parallèlement, nous avons observé, sous l'effet de ce stimulus, l'apparition d'un dépôt de FH à la surface des cellules traitées, sans que l'hème ne semble induire d'altération de ses propriétés de régulation membranaire. Le FH pourrait ainsi compenser, à la façon de ce qui est observé à la surface des cellules apoptotiques, la baisse d'expression membranaire de MCP et de DAF, rendant compte de son rôle particulièrement important dans ces

conditions d'activation, et par projection dans les pathologies hémolytiques. Il est ici intéressant de rappeler que les dysfonctions du FH sont les principales anomalies rapportées actuellement dans le SHUa.

3. Enfin, nous avons montré que l'exposition des cellules endothéliales à l'hème déclenchait une mobilisation de leurs corps de Weibel-Palade, se traduisant par la libération de FvW et l'expression membranaire de P-selectine. Cette dernière est capable de lier le C3b et de servir de plateforme à la formation d'une C3 convertase alterne, participant ainsi à activer la voie alterne du complément. D'autre part, la libération de multimères de THPM du FvW par les corps de Weibel-Palade endothéliaux constitue un autre mécanisme par lequel l'hémolyse peut induire l'acquisition d'un phénotype endothélial prothrombotique, susceptible d'amplifier les lésions de MAT.

Par ailleurs, en nous appuyant sur les données de la littérature, nous proposons deux autres hypothèses de mécanismes par lesquels l'hème puisse induire une activation de la voie alterne à la surface des cellules endothéliales : d'une part, l'hème peut s'intercaler dans les bicouches lipidiques⁴⁵² et pourrait ainsi favoriser, à la surface des cellules, une activation du complément, telle qu'observée en phase fluide ; d'autre part, l'hème peut induire une rétraction cellulaire⁵²⁰, susceptible d'exposer la matrice extracellulaire capable d'activer le complément.

Conclusion

- L'hème libre, dérivé de l'hémolyse, active la voie alterne du complément en phase fluide, ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales.
- En phase fluide, l'hème augmente l'efficacité de la C3 convertase alterne et les interactions C3/C3, ce qui est susceptible de faciliter la formation d'une C5 convertase.
- A la surface des cellules, l'hème induit une réduction de l'expression de régulateurs membranaires du complément et la libération endothéliale de P-selectine, mécanismes tous deux susceptibles de favoriser une activation du complément.
- L'hémolyse pourrait ainsi, en activant le complément et via ses effets endothéliaux prothrombotiques et proinflammatoires, induire un dépassement des capacités de tolérance des cellules endothéliales et exacerber alors les lésions de MAT dans le SHUa.



Frimat Blood 2013.pdf

Chapitre 3 : Résultats complémentaires

1. Relatifs à l'utilisation de matériels de patients

Objectifs

L'une des difficultés rencontrées au cours de ce projet s'est révélée liée à la disponibilité des sérums de patients. Le modèle cellulaire in vitro d'activation du complément à la surface de cellules endothéliales, que nous avons initialement mis au point et employé dans les articles 1 et 2, requiert en effet du sérum, au sein duquel les protéines de la coagulation ont été préalablement consommées. Cependant, la disponibilité du sérum de patients s'est avérée moins importante que celle du plasma, ce qui a pu constituer un frein à la répétition de certaines expériences. En effet, les prélèvements adressés au centre de référence des SHUa, dans le service d'immunologie biologique de l'HEGP, sont majoritairement du plasma (recueilli en tubes EDTA). Ce matériel permet l'étude quantitative (à partir de la phase plasmatique) et génétique (à partir du culot cellulaire obtenu après centrifugation) des protéines du complément et son transport est simple, pouvant être réalisé à +4°C, sans traitement préalable des tubes.

De fait, outre la mise au point d'une technique requérant un volume moins important de sérum (ELISA cellulaire étudiant le dépôt membranaire de C3 - article 2), nous avons défini des conditions dans lesquelles ce plasma collecté pourrait être utilisé, comme source de complément, pour les tests fonctionnels réalisés in vitro sur cellules endothéliales.

Méthode

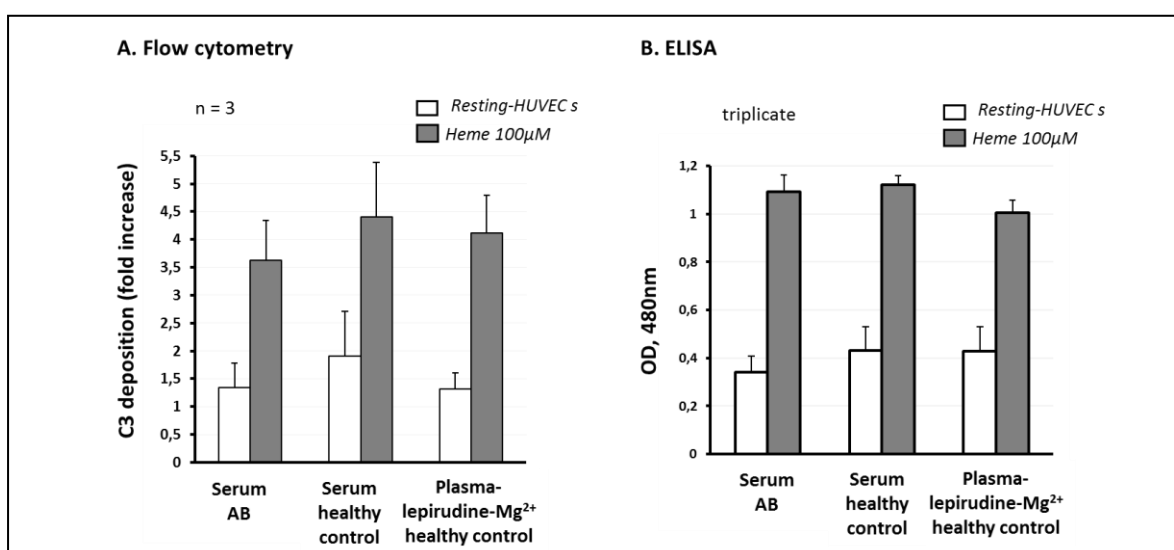
Nous avons, en premier lieu, exposé des cellules endothéliales (HUVECs) à du sérum ou du plasma (dilution 1:5), issu d'un même témoin. De la lepirudine et du Mg^{2+} étaient additionnés aux échantillons de plasma-EDTA avant chaque expérience, dans le but, respectivement, de bloquer la formation de thrombi et de ne pas être limitant en ions Mg^{2+} , ces derniers étant nécessaire à l'activation de la voie alterne du complément. Nous avons comparé, en cytométrie de flux et ELISA, les dépôts membranaires de C3c observés à la

surface de ces cellules, en condition native ou après incubation 20 minutes à 37°C avec de l'hème (100µM), et défini les doses adéquates de lepirudine (50µg/ml) et de Mg²⁺ (5mM). Nous avons secondairement étudié, dans les mêmes conditions, le dépôt de C3c membranaire en utilisant des plasmas normaux (n=13) et des plasmas de patients ayant présenté un SHUa, porteurs d'une mutation du FH (n=5).

Résultats

1/ Nous n'avons pas observé de différence significative des dépôts de C3c à la surface des cellules selon l'utilisation de sérum ou de plasma-lepirudine-Mg²⁺ issu du même témoin.

Figure n°22 : L'activation du complément à la surface de cellules endothéliales est comparable, que la source de complément soit du sérum ou du plasma.

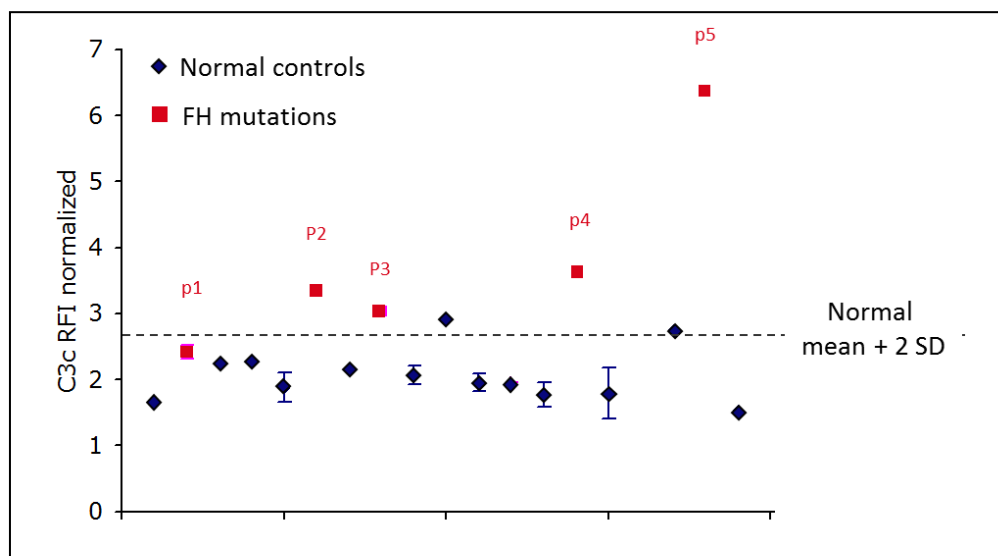


Des HUVECs, natives ou prétraitées par de l'hème (100µM), étaient incubées, après un lavage en PBS, en présence de sérum ou de plasma supplémenté avec de la lépirudine (50µg/ml) et du Mg²⁺ (5mM) (30', 37°C). Les cellules étaient ensuite traitées selon la méthodologie précédemment décrite (article 2, figure 2) et le dépôt membranaire de C3c était étudié : **A.** en cytométrie de flux, après détachement des cellules (ac anti-C3c, Quidel), résultats exprimés en moyenne de RFI (n=3). **B.** en ELISA, après fixation des cellules en PFA (ac anti-C3c biotinylé, Quidel), résultats exprimés en moyenne de densité optique (480nm) à partir d'un triplicate issu d'une même expérience (histogramme représentatif de 3 expériences indépendantes).

2/ L'étude, en cytométrie de flux, des dépôts de C3c à la surface d'HUVECs incubées en présence de plasmas-lepirudine-Mg²⁺ issus de donneurs sains ou de patients, a montré des résultats proches de ceux préalablement observés en cas d'utilisation de sérums dans les mêmes conditions. En effet, sur cellules natives, nous n'avons pas observé de différence du

dépôt membranaire de C3 entre plasmas-contrôles et plasmas-patients. Par contre, en cas de prétraitement des cellules par de l'hème, il existait une augmentation de ce dépôt supérieure avec les plasmas-patients par rapport aux plasmas-contrôles (cette expérience nécessitera néanmoins d'être répétée pour affirmer la significativité de ces résultats).

Figure n°23 : L'activation du complément à la surface de cellules endothéliales prétraitées par de l'hème est amplifiée en présence de plasma issu de patients souffrant de SHUa



Etude en cytométrie de flux du dépôt membranaire de C3c (ac anti-C3c, Quidel) à la surface d'HUVECs, prétraitées par de l'hème (100µM), puis incubées, après un lavage en PBS, en présence de plasmas contrôles (n=13, en bleue) ou issus de patients (n=5, en rouge), supplémentés selon les conditions prédéfinies. Résultats exprimés en RFI (n=1 ou 2). La ligne pointillée représente la moyenne des RFI des plasmas-contrôles + 2 déviations standards.

Conclusion

Le plasma, aussi bien que le sérum, semble pouvoir être utilisé, comme source de complément, pour l'étude de l'activation de ce système à la surface des cellules endothéliales. Son utilisation dans ce but requiert, néanmoins, une inhibition de la coagulation par de la lépirudine et une supplémentation avec du Mg^{2+} .

Cette mise au point pourra nous permettre d'employer au besoin, au cours de futurs travaux, du plasma dont la collecte s'avère plus facile que celle du sérum. En effet, il présente l'avantage, par rapport au sérum, de ne pas nécessiter, d'une part d'attendre la coagulation avant isolement/séparation des cellules du sang par centrifugation et d'autre part d'être rapidement congelé.

2. Relatifs à l'étude des facteurs de prédisposition au SHUa

Objectifs

Notre travail autour de la mutation C3_{R139W} a confirmé l'influence de certains polymorphismes portés par les gènes du MCP ou du FH dans la pénétrance du SHUa.

Dans le but de poursuivre l'étude des facteurs de susceptibilité au SHU, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'haplotype MCP ggaac, polymorphisme prédisposant au SHUa²⁸⁰. Celui-ci se compose de 5 SNP, dont 2 sont situés dans la région promotrice du gène de MCP⁵⁶³, ce qui a suggéré que cet haplotype pourrait moduler négativement l'expression de la protéine MCP et ainsi diminuer la protection des cellules face à l'activation du complément.

De façon à étudier cette hypothèse, nous avons analysé les taux d'expression membranaire de MCP ainsi que le dépôt de C3 à la surface de cellules endothéliales (HUVEC), plus ou moins porteuses de ces SNP à risque.

Méthode

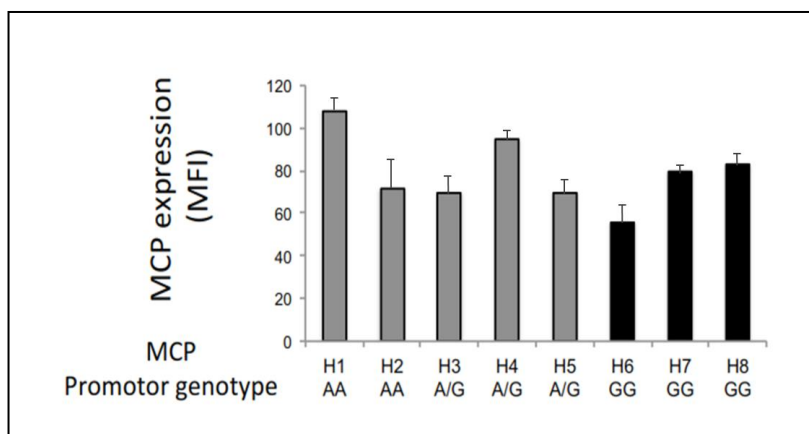
Le gène de MCP de différentes préparations d'HUVECs, issues de 30 cordons ombilicaux distincts, a été analysé par les soins de l'équipe du Dr Frémeaux-Bacchi, à partir de leur ADN préalablement extrait. Parmi ces échantillons, 3 se sont révélés être porteurs de l'haplotype à risque sous sa forme homozygote (identifié dans ce travail comme GG).

Nous avons donc décongelées et mises en culture certaines des HUVECs, dont le génotype de MCP était identifié, et qui avaient été préalablement congelées dans l'azote : des HUVECs homozygotes pour l'haplotype MCP à risque (GG ; n=3), hétérozygotes (AG ; n=3) ou ne portant pas cet haplotype (AA ; n=2). Nous avons mesuré, par cytométrie de flux, l'expression de MCP à la surface de ces différentes HUVECs, en condition native ou après incubation 15h avec des cytokines inflammatoires (TNF α , IFN γ et IL-1 β aux concentrations respectives de 10ng/ml, 1000UI/ml, 10ng/ml) ou 20 minutes avec de l'hème (100 μ M). Parallèlement, pour étudier la capacité de ces cellules à activer le complément, nous avons mesuré, dans ces mêmes conditions, le dépôt membranaire de C3c, après incubation de ces cellules en sérum humain normal (sérum de groupe AB, NHS) ou en sérum déplété en facteur H, dans les deux cas dilués au 1: 5.

Résultats

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative des taux d'expression de MCP entre les HUVECs GG, AG ou AA, aussi bien en conditions natives (figure n°24), qu'après traitement par des cytokines ou de l'hème.

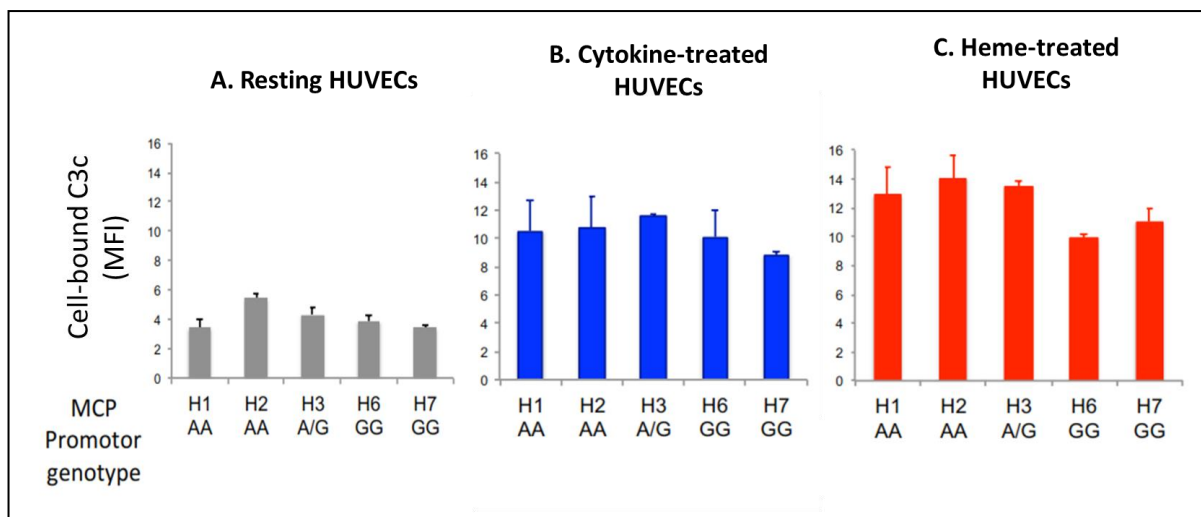
Figure n°24 : L'expression membranaire de MCP à la surface de cellules endothéliales natives n'est pas influencée par l'haplotype MCP ggaac

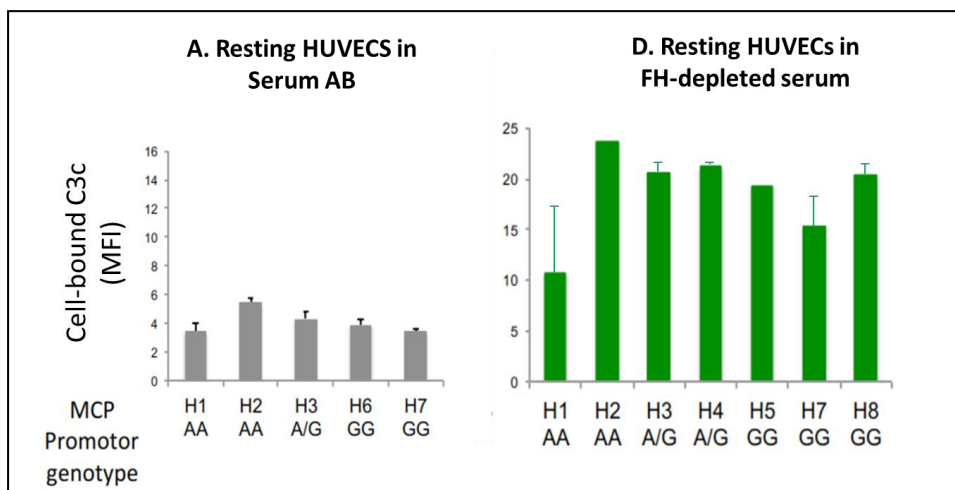


Etude en cytométrie de flux de l'expression membranaire de MCP (ac anti-MCP marqué à la phycoerythrine, AbD Serotec) à la surface d'HUVECs natives présentant différents génotypes de MCP. Résultats exprimés en moyenne de MFI, (n=2).

De même, nous n'avons pas observé de différence significative du dépôt membranaire de C3c selon l'haplotype de MCP et ce, aussi bien en conditions natives qu'après activation par des cytokines ou de l'hème. L'exposition à un sérum déplété en FH ne révélait pas non plus de différence du dépôt de C3c membranaire entre ces cellules.

Figure n°25 : L'activation du complément à la surface de cellules endothéliales n'est pas influencée par l'haplotype MCP ggaac





Comparaison en cytométrie de flux du dépôt membranaire de C3c (ac anti-C3C, Quidel) à la surface de différentes HUVECs (AA, AG ou GG), exposées à différentes conditions d'activation : **(A)** HUVECs incubées en présence de NHS, en l'absence d'activation préalable ou **(B)** après traitement par un cocktail de cytokines proinflammatoires (TNF α , IFN γ et IL-1 β) ou **(C)** par de l'hème (100 μ M); **(D)** HUVECs natives incubées en présence de sérum déplété en FH. Résultats exprimés en moyenne de MFI, (n=2).

Conclusion

Ainsi, nous avons montré que l'haplotype MCP gggac, qui prédispose au SHUa, n'influe pas sur le taux d'expression de MCP à la surface des cellules endothéliales (HUVECs) ou sur leur capacité à activer le complément.

Ces résultats suggèrent que la prédisposition au SHU amenée par cet haplotype n'est pas secondaire à une altération quantitative ou fonctionnelle de la protéine MCP à la surface des cellules endothéliales. Ces conclusions renforcent encore la complexité génétique des SHUa et suggèrent des fonctions encore inconnus de MCP susceptibles de participer à la physiopathologie du SHUa.

Résultats présentés en 2012, en communication affichée, au 24th International Complement Workshop (Chania, Grèce).

3. Relatifs à l'étude des marqueurs de souffrance endothéliale en présence d'une anomalie de régulation du complément

Objectifs

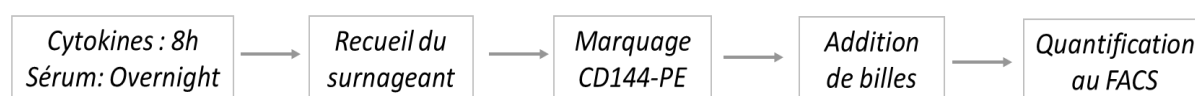
Parallèlement à l'étude de certains marqueurs d'acquisition d'un phénotype endothélial prothrombotique (expression membranaire de FT, libération de FvW), nous avons étudié deux marqueurs susceptibles de traduire une souffrance cellulaire : le détachement cellulaire et la perte d'intégrité de la monocouche cellulaire. Nous avons recherché si l'exposition des cellules à un sérum au complément dérégulé entraînait une majoration de ces signes de souffrance.

Méthodes

Le détachement spontané des cellules a été étudié après incubation de cellules adhérentes (HUVECs), cultivées en plaque 24 puits, pendant 15h à 37°C, en présence de NHS, de sérum déplété en FH ou de sérum de patients porteurs de la mutation C3_{R139W}. Les cellules étaient, plus ou moins, préalablement activées par un cocktail de cytokines proinflammatoires (TNF α -IFN γ) pendant 8h à 37°C, étape suivie d'un lavage (PBS tiède).

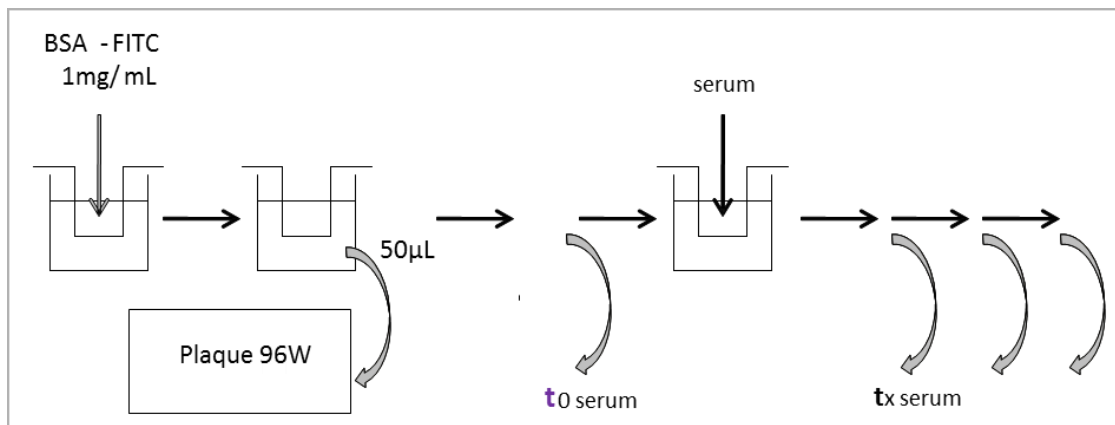
Après l'étape d'incubation avec les différents sérums, un échantillon de 100 μ L du surnageant de chaque puit était prélevé après homogénéisation. Les cellules étaient marquées avec un anticorps anti-CD144 marqué à la phycoerythrine, de façon à s'assurer de leur nature endothéliale lors de l'étape de comptage. Au volume prélevé était additionné 100 μ L de dilution de billes de latex calibrées de 3 μ m (Sigma) diluées au 1/40000^{ème}. La quantification du nombre de cellules et de billes était évaluée par cytométrie de flux. Le rapport entre le nombre de cellules et le nombre de billes de latex autorisait la comparaison des échantillons entre eux, en permettant de s'affranchir de l'irrégularité de la vitesse d'aspiration des prélèvements en cytométrie de flux.

Figure n°26 : Etude du détachement cellulaire : méthodologie schématique



L'intégrité de la monocouche cellulaire était évaluée par un test de perméabilité basé sur la mesure du passage d'albumine fluorescente à travers une couche de cellules endothéliales cultivées sur matériel spécifique (Transwell). Les cellules cultivées dans ces conditions étaient, plus ou moins, préalablement activées par un cocktail de cytokines proinflammatoires (TNF α -IFN γ) pendant 15h à 37°C, puis lavées délicatement avec du PBS tiède. Les cellules étaient ensuite exposées, pendant 30 minutes à 37°C, à du sérum normal (NHS), déplété en FH ou issu d'un patient porteur de la mutation C3_{R139W}. La BSA marquée à la FITC était additionnée (1mg/ml) au milieu contenu dans le transwell avant l'étape d'incubation avec le sérum. Toutes les 30 min, 50 μ L de milieu contenu dans le fond du puits de la plaque P24 était prélevé et recueilli dans une plaque 96 puits, à l'abri de la lumière. A la fin du temps de recueil, la mesure de la fluorescence était mesurée (DO, 480nm).

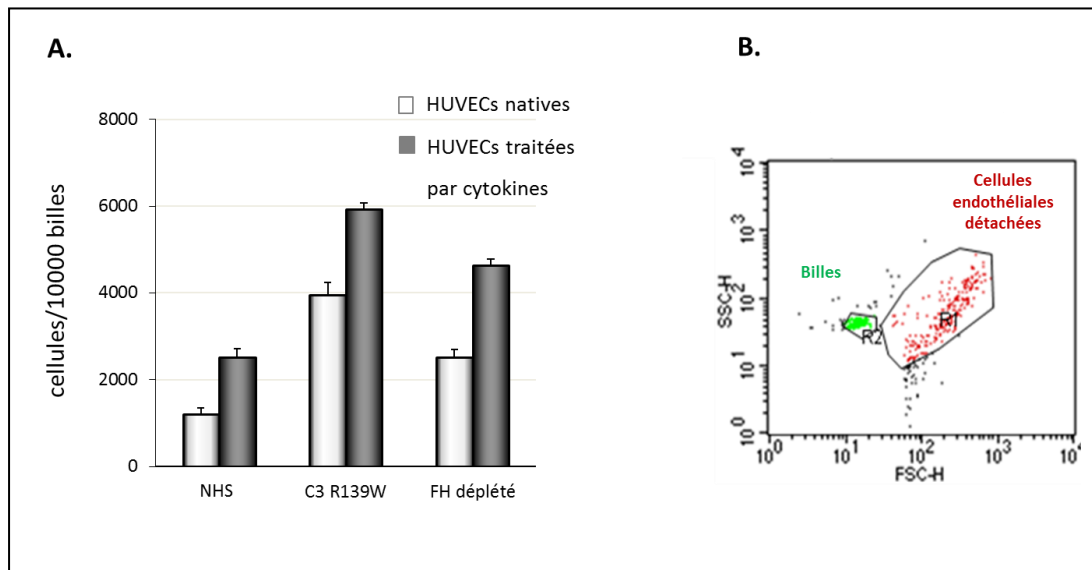
Figure n°27: Etude de la perméabilité cellulaire : méthodologie schématique



Résultats

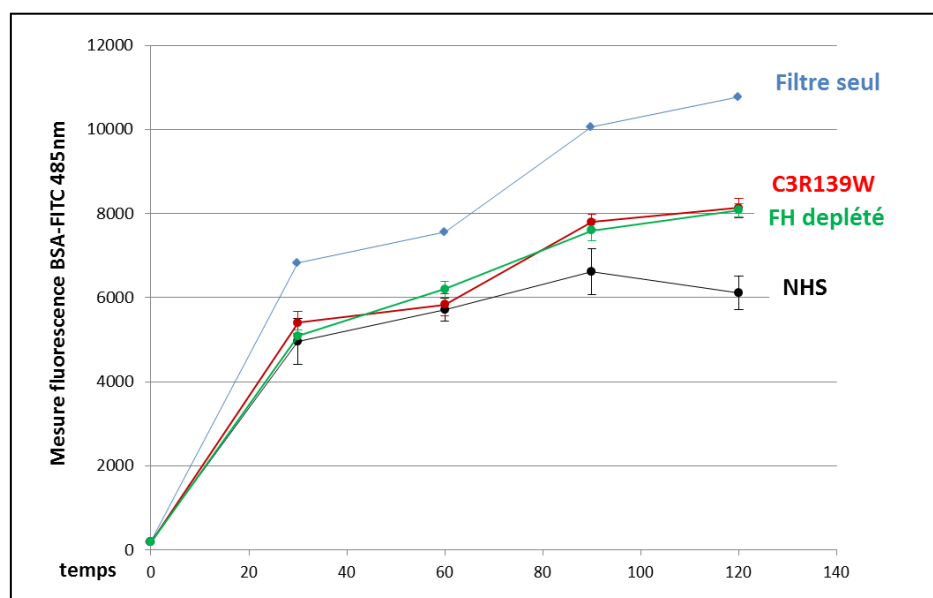
En présence d'un sérum dont le complément est mal régulé (FH-déplété, sérum de patient porteur de la mutation C3_{R139W}), nous avons observé une augmentation significative du détachement spontané des cellules (Figure n°28) ainsi qu'une augmentation de la perméabilité cellulaire (Figure n°29).

Figure n°28 : Augmentation du détachement spontané des cellules en présence de sérum au complément dérégulé



A. HUVECs, natives ou incubées en TNF α -IFN γ 8h, spontanément détachées après incubation une nuit en sérum normal (NHS), sérum déplété en FH, ou sérum de patient C3_{R139W}, (n=3).
B. Exemple de nuage de points obtenu en cytométrie de flux (FSC : taille, SSC : granulométrie), où R1, en rouge, désigne les HUVECs spontanément détachées et R2, en vert, les billes.

Figure n°29 : Augmentation de la perméabilité de la monocouche cellulaire en présence de sérum au complément dérégulé



HUVECs cultivées sur Transwell, préactivées par des cytokines (TNF α -IFN γ - 15h, 37°C), puis incubées en présence de NHS, de sérum de patient-C3R139W ou de sérum déplété en FH. Graphique représentatif de 3 expériences indépendantes comparables.

Conclusion

Ces résultats nécessiteront d'être confirmés avec d'autres sérums de patients porteurs d'anomalie de régulation du complément, mais il suggère néanmoins que l'exposition des cellules endothéliales à de tels sérums induit une souffrance cellulaire. Nous avons en effet observé, dans ces conditions, une augmentation du détachement cellulaire, et ce même en l'absence de pré-activation des cellules par des cytokines proinflammatoires. Ce détachement cellulaire in vitro semble faire écho aux caractéristiques histologiques rénales des MAT, dans lesquelles sont décrites des espaces clairs sous-endothéliaux, traduction du décollement des cellules endothéliales in vivo.

Nous avons également mis en évidence une augmentation de la perméabilité des cellules, en faveur d'une perte d'intégrité de la monocouche cellulaire. Celle-ci pourrait être secondaire à des phénomènes de détachement ou de rétraction cellulaire, induits par les produits de l'activation du complément. Nous avons vu, par exemple, que les anaphylatoxines augmentaient la perméabilité endothéliale en provoquant une rétraction cellulaire³⁹.

L'approfondissement de ces résultats dans le but d'en préciser les mécanismes et les conséquences constituera une perspective intéressante. En effet, que ce soit par l'intermédiaire du détachement cellulaire, potentiellement générateur de cellules endothéliales circulantes ou de la rétraction cellulaire, susceptible d'exposer le sous-endothélium, ces deux mécanismes pourraient participer indépendamment à amplifier l'activation du complément.

Conclusion et Perspectives

En premier lieu, ce travail a permis la mise au point d'un modèle cellulaire endothélial reproductible (cytométrie de flux, ELISA et immunofluorescence), permettant d'évaluer le dépôt de C3 à la surface des cellules endothéliales. Nous l'avons appliqué à l'étude du SHUa et montré que l'exposition de cellules, préalablement activées, à du sérum porteur d'anomalies de régulation du complément - sérum de patients, sérum immunodéplété (FH, FI), sérum additionné d'anticorps bloquant des protéines régulatrices (FH, MCP) - induisait une amplification de l'activation de ce système à leur surface. Ce modèle cellulaire, in vitro, pourrait être utilisé pour étudier l'influence d'autres facteurs (LDL oxydés, produits de glycation avancée) sur l'activation endothéliale du complément, dans le cadre d'autres pathologies pour lesquelles un rôle de ce système est suggéré, telles que l'athérosclérose¹ ou le diabète⁵⁶⁴.

Dans le cadre plus précis de ce projet, ce modèle expérimental a constitué le point de départ de travaux plus approfondis sur l'étude des conséquences de l'exposition endothéliale à un complément mal régulé. A travers l'exemple de la mutation C3_{R139W}, portée par 14 patients ayant présenté un SHUa, nous avons mis en évidence un lien entre l'existence d'une anomalie de régulation du complément et l'acquisition d'un phénotype endothélial activé. En effet, outre une augmentation du dépôt de C3 à la surface des cellules, nous rapportons la mise en œuvre des voies effectrices du complément (libération de C3a, C5a, C5b-9s), l'expression endothéliale de médiateurs procoagulants (facteur tissulaire) et l'apparition de marqueurs suggérant une souffrance endothéliale (détachement cellulaire, augmentation de la perméabilité endothéliale - *données non publiées*). Ce travail a été complété par la caractérisation fonctionnelle de la mutation C3_{R139W}, à l'origine de la première description d'une mutation C3 gain de fonction direct et par la description phénotypique des SHUa associés à cette mutation, qui constitue pour l'heure la série la plus importante de patients porteurs de la même mutation. De façon intéressante, malgré cette anomalie commune, la pénétrance et l'expression du SHU se

sont avérées hétérogènes, confirmant l'importance des facteurs additionnels et notamment des polymorphismes à risques (FH gtgt, MCP ggaac).

Ce travail a également permis d'identifier l'hème, produit de l'hémolyse intravasculaire, qui par définition est présente dans le SHU, comme un puissant activateur de la voie alterne du complément, aussi bien en phase fluide qu'à la surface des cellules endothéliales. Cette activation était amplifiée en cas de dysrégulation sous-jacente de la voie alterne, suggérant un rôle potentiel de l'hémolyse dans la physiopathologie du SHU complément-dépendant. Nous avons complété ce travail par l'identification de plusieurs des mécanismes d'action de l'hème sur le complément : direct, en phase fluide, via la formation d'une hyper C3/C5 convertase ou indirect en induisant d'une part, une diminution de l'expression membranaire de certaines protéines régulatrices (MCP, DAF) ou d'autre part, la libération de P-selectine à la membrane endothéliale. L'hémolyse pourrait ainsi constituer une cible thérapeutique éventuelle des SHU, indépendamment d'ailleurs de l'existence sous-jacente d'une anomalie de régulation du complément, puisque si les effets observés étaient amplifiés en présence d'un sérum pathologique, ils existaient également en sérum normal.

Si ces travaux ont permis d'éclaircir quelque peu la physiopathologie du SHU rattaché à des anomalies de régulation du complément, il persiste plusieurs zones d'ombre. Il serait ainsi intéressant de poursuivre :

- l'identification de facteurs amplifiant l'activation du complément, et ceci dans le but de développer d'éventuelles stratégies préventives. La connaissance parfaite de l'ensemble des facteurs de susceptibilité intrinsèques et extrinsèques permettra, en effet, de mieux définir les sous populations à risque de récurrence.
- la caractérisation des conditions dans lesquelles une cellule endothéliale devient activatrice du complément, en précisant notamment le rôle d'autres acteurs, tels que les polynucléaires neutrophiles et les plaquettes, dans la genèse des lésions endothéliales complément-dépendantes.

Parmi les perspectives particulièrement intéressantes de ce projet de recherche, étudier les mécanismes susceptibles d'expliquer la localisation préférentiellement rénale des

lésions de MAT associée à une activation excessive de la voie alterne du complément constitue un point fort, sur lequel nous souhaitons travailler dans les prochains mois.

Comme nous l'avons vu précédemment, les atteintes extra-rénales lors des SHU associés à des anomalies de régulation du complément ne sont pas exceptionnelles, cependant le rein semble constituer une cible privilégiée du complément dérégulé. Pour exemple, Noris et al rapportent le cas de deux sœurs toutes deux porteuses d'un déficit constitutionnel en ADAMTS-13 (activité < 10%), associé pour seulement l'une d'entre elle à une mutation du FH (haplo-insuffisance). Tandis que l'expression clinique des épisodes de MAT est strictement neurologique dans le premier cas, celle de la patiente porteuse de la mutation du FH inclue également une insuffisance rénale⁵⁶⁵. Cette apparente susceptibilité rénale face à une activation excessive de la voie alterne s'observe également dans d'autres pathologies. D'une part, elle apparaît au travers des glomérulopathies à C3 (maladie à dépôts denses, glomérulonéphrite à dépôts isolés de C3, néphropathie CFHR5), dont les mécanismes physiopathologiques impliquent, tout comme dans le SHU, des anomalies génétiques ou acquises (C3Nef), responsables d'une activation excessive de la voie alterne⁵⁶⁶. D'autre part, elle est suggérée dans les vascularites associées aux ANCA, pour lesquelles Xiao et al ont montré dans un modèle murin de vascularite avec glomérulonéphrite extra-capillaire induite par injection d'anticorps anti-MPO, qu'en cas d'invalidation de la voie alterne (souris FB^{-/-}), il ne survenait alors plus de lésions rénales⁵⁶⁷. Cependant, les mécanismes expliquant le tropisme rénal des lésions induites par la voie alterne du complément restent indéterminés et peu étudiés. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées : i/ d'une part, comme nous l'avons vu précédemment, le rein, par l'intermédiaire des cellules glomérulaires et épithéliales tubulaires, constitue un site important de synthèse extra-hépatique de C3. Cette production locale de C3, déjà incriminée dans d'autres pathologies ou modèles de pathologies rénales (rejet d'allogreffe⁸⁸; modèle murin de néphropathie induite à l'adriamycine⁸⁷) pourrait ainsi participer à la spécificité des lésions rénales de MAT dans les SHU compléments-dépendants ; ii/ d'autre part, comme nous l'avons également abordé, les lits capillaires présentent des spécificités structurelles et fonctionnelles variables d'un organe à un autre, selon la fonction de ce dernier. Les capillaires glomérulaires, pour leur part, sont de type continu fenêtré et constituent une membrane d'ultrafiltration hautement spécialisée,

capable de filtrer d'important volume plasmatique tout en retenant efficacement les protéines dans l'espace vasculaire. Ainsi, les fonctions de filtration et/ou la rhéologie particulière du rein interviennent peut-être dans cette spécificité lésionnelle du complément. Par ailleurs, à la manière des SHU-Stx, dont le tropisme rénal est rattaché à l'expression par les cellules endothéliales de récepteur Gb3, l'endothélium rénal pourrait présenter des spécificités dans la distribution des protéines régulatrices du complément ou de la coagulation.

Nos travaux, au sein du laboratoire, ont jusqu'alors été principalement réalisés sur deux modèles cellulaires endothéliaux (HUVECs et GEnCs). Roumenina et al ont d'ailleurs rapporté, lors d'un travail antérieur portant sur l'étude de mutations gain de fonction du FB, un dépôt membranaire de C3 significativement supérieur sur les GEnCs que sur les HUVECs, après incubation en présence de sérum auquel été additionné du FB muté (protéines recombinantes)¹⁹⁵.

Dans le but d'approfondir ces données, nous avons récemment acquis au laboratoire des cultures primaires de cellules endothéliales provenant de différents organes (rein, poumon, cœur, cerveau) d'origine commerciale (ScienCell Research Laboratories). Nous disposons, par ailleurs, en plus des GEnC, d'une autre lignée de cellules microvasculaires issues du derme (HMEC-1), également immortalisée par SV40. Nous projetons de comparer les caractéristiques intrinsèques de ces différents types cellulaires. Outre leur capacité à activer le complément, nous étudierons l'expression des différents régulateurs membranaires (MCP, DAF, CD59) ainsi que la liaison éventuelle de FH, en condition native ou après activation par différents stimuli que nous avons déjà eu l'occasion d'utiliser précédemment (cytokines inflammatoires, facteurs de croissance, hème libre, thrombine, neuraminidase, ...).

Nous espérons ainsi dégager d'éventuelles spécificités de l'endothélium glomérulaire rénal, susceptibles d'expliquer en partie l'expression majoritairement rénale des lésions endothéliales complément-dépendantes.

Une autre perspective issue de ce projet sur laquelle nous souhaiterions concentrer nos recherches concerne la mise au point d'un test fonctionnel rapide permettant de définir le caractère complément-dépendant ou non d'un épisode de SHU.

En effet, les résultats prometteurs de l'Eculizumab dans le traitement des SHUa, et ce parfois en l'absence d'anomalie sous-jacente de régulation du complément identifiée, ainsi que l'accumulation d'arguments, suggérant un rôle de l'activation du complément dans d'autres formes étiologiques de SHU, soulèvent de plus en plus de questions parmi les cliniciens autour des indications de cet anti-C5. Ce d'autant plus que la rapidité d'initiation de ce traitement semble associée à une meilleure récupération fonctionnelle rénale. Les SHU-Stx illustrent bien cette situation : l'Eculizumab n'a pour l'heure pas l'AMM dans cette forme étiologique de SHU. Néanmoins, son utilisation lors de l'épidémie allemande, bien qu'ayant rapporté des résultats mitigés, s'est associée chez certains patients à une nette amélioration clinique. Ainsi, il serait intéressant de déterminer des outils permettant de définir les sous-populations de patients chez qui ce traitement pourrait s'avérer bénéfique.

Dans cette optique, nous pourrions utiliser le modèle cellulaire précédemment décrit. Celui-ci pourrait permettre d'analyser la capacité du sérum d'un patient atteint de SHU ou d'un autre tableau clinique de MAT, à induire un dépôt de C3 à la surface des cellules, traduisant la mise en œuvre de la cascade du complément à leur surface. Ce test pourrait permettre d'indiquer, de façon rapide, le caractère complément-dépendant ou du moins une participation du complément dans la formation des lésions de MAT et guider ainsi éventuellement la prise en charge thérapeutique des patients.

Cette analyse pourrait être réalisée par cytométrie de flux ou par ELISA cellulaire, ce dernier présentant l'avantage d'être de réalisation rapide et de nécessiter un volume d'échantillon de patient peu important (volume minimal : 15 à 20 μ L par puit). D'autre part, nous avons vu que nous pourrions utiliser, en place du sérum, du plasma (traité avec de la lépirudine et Mg²⁺), ce qui pourrait faciliter l'obtention d'un plus large panel d'échantillons visant à valider ce test. Nous pourrions, par ailleurs, compléter cette analyse en étudiant, en cas de dépôt membranaire de C3, si l'apparition concomitante de complexe d'attaque membranaire à la membrane est significativement réduite par l'adjonction d'un anti-C5 au sérum des patients.

Nous espérons ainsi finaliser un test fonctionnel dont l'objectif serait de guider la mise en œuvre d'un traitement inhibant le complément face à un tableau clinique de MAT.

Une des limites de cette technique réside néanmoins dans la nécessité d'avoir un accès rapide à des cellules endothéliales en culture. Ainsi, une autre stratégie pourrait résider dans l'utilisation d'un dosage plasmatique du C5b-9 soluble chez les patients.

Enfin, comme nous l'avons abordé dans la dernière partie des résultats, nous souhaiterions poursuivre nos travaux autour du détachement cellulaire et de l'augmentation de la perméabilité observés en cas d'exposition des cellules endothéliales à un sérum porteur d'une anomalie de régulation du complément. En premier lieu, nous confirmerons ces résultats avec d'autres sérums de patients et dans d'autres conditions artificielles de dérégulation du complément (sérum FI-déplété, utilisation d'ac anti-FH ou anti-MCP bloquant, ou de protéines recombinantes), de la façon décrite dans l'article 2 (figure 3).

Dans un deuxième temps, concernant spécifiquement l'étude du détachement cellulaire, nous préciserons la nature de ces cellules spontanément détachées sous l'effet de sérums pathologiques. Nos données préliminaires tendent à démontrer que ces cellules sont apopto-nécrotiques (marquage annexin/iodure de propidium et analyse en cytométrie de flux, *données non montrées*). Ces résultats rappellent ce qui est décrit dans les vascularites associées aux ANCA. En effet, Woywodt et al ont rapporté chez ces patients un nombre élevé de cellules circulantes, comparativement à une population de témoins sains, présentant une infection ou une glomérulonéphrite non associée aux ANCA. Ils ont montré que plus de 80% de ces cellules étaient apoto-nécrotiques (annexin/iodure de propidium +) et exprimaient à leur surface du facteur tissulaire, suggérant ainsi qu'elles participent à la physiopathologie de cette maladie⁵⁶⁸. Sachant que les cellules apopto-nécrotiques activent fortement le complément via la voie classique et alterne^{69,569}, la présence de cellules détachées apoptotiques sous l'effet d'un complément dérégulé pourrait constituer un autre mécanisme d'amplification des lésions complément-dépendantes dans le SHUa. Nous confirmerons donc la capacité des cellules détachées à activer le complément (marquage C3c, C5b-9). Nous pourrions également évaluer le taux d'apoptose/nécrose des cellules adhérentes (marquages Hoechst 33342, Iodure de propidium et TUNEL) et préciser les

mécanismes inducteurs en étudiant par exemple, l'effet des inhibiteurs de la voie JAK/STAT, qui protégeraient les cellules endothéliales contre le détachement et l'apoptose⁵⁷⁰.

Parallèlement, nous tenterons de préciser les mécanismes conduisant à l'augmentation de la perméabilité cellulaire sous l'effet d'un complément dérégulé. Nous confirmerons les résultats décrits par Schraufstatter et al sur des HUVECs et des HMECs, selon lesquels les anaphylatoxines, en particulier le C5a, augmentent la perméabilité cellulaire via une rétraction des cellules associée à une polymérisation de l'actine³⁹. Nous pourrions notamment compléter ce travail : i/ en suivant l'état des jonctions endothéliales (marquages VE-cadherine, PECAM-1) en immunofluorescence après stimulation par du C5a et du sérum de patients ; ii/ en étudiant l'effet d'un complément dérégulé sur l'activité de la MLCK (Myosin Light Chain Kinase), se traduisant par la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et pouvant être à l'origine de modifications du cytosquelette et d'une rétraction cellulaire⁵⁷¹. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la MLCK (ML-9 par exemple) pourrait nous permettre d'évaluer l'importance de cette voie dans la rétraction complément-induite. Si nous confirmons la rétraction cellulaire en immunofluorescence, nous mesurerons par ailleurs les dépôts de complément sur la matrice sous-endothéliale exposée⁴¹³. Comme nous l'avons évoqué lors de la présentation des travaux relatifs à l'hème, nous suggérons que ce mécanisme participe également à amplifier l'activation du complément.

L'ensemble de ces travaux pourrait permettre d'améliorer encore la connaissance des mécanismes physiopathologiques du SHU et ainsi la prise en charge des patients.

Bibliographie

1. Speidl WS, Kastl SP, Huber K, Wojta J. Complement in atherosclerosis: friend or foe? *J Thromb Haemost.* 2011;9:428-440.
2. Nuttal G. *Z. Hyg. Infectiouskr.* 1888;4:353-356.
3. Ehrlich PM, J. . *Berl Klin Wochenschr* 1899;36:6-9
4. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010;11:785-797.
5. Nonaka M, Kimura A. Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics.* 2006;58:701-713.
6. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:1058-1066.
7. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:1140-1144.
8. Ricklin D, Lambris JD. Complement in immune and inflammatory disorders: therapeutic interventions. *J Immunol.* 2013;190:3839-3847.
9. de Cordoba SR, Tortajada A, Harris CL, Morgan BP. Complement dysregulation and disease: from genes and proteins to diagnostics and drugs. *Immunobiology.* 2012;217:1034-1046.
10. Bindon CI, Hale G, Bruggemann M, Waldmann H. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med.* 1988;168:127-142.
11. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaeble WJ, Keeble AH. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology.* 2010;215:1-11.
12. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle. *Trends Immunol.* 2004;25:368-373.
13. Dodds AW, Ren XD, Willis AC, Law SK. The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature.* 1996;379:177-179.
14. Sim RB, Porter RR, Reid KB, Gigli I. The structure and enzymic activities of the C1r and C1s subcomponents of C1, the first component of human serum complement. *Biochem J.* 1977;163:219-227.
15. Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J Biol Chem.* 1987;262:7451-7454.
16. Chen CB, Wallis R. Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J Biol Chem.* 2004;279:26058-26065.
17. Rossi V, Cseh S, Bally I, Thielens NM, Jensenius JC, Arlaud GJ. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Biol Chem.* 2001;276:40880-40887.
18. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med.* 1981;154:856-867.
19. Fishelson Z, Pangburn MK, Muller-Eberhard HJ. Characterization of the initial C3 convertase of the alternative pathway of human complement. *J Immunol.* 1984;132:1430-1434.
20. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. C3b deposition during activation of the alternative complement pathway and the effect of deposition on the activating surface. *J Immunol.* 1983;131:1930-1935.
21. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 2006;12:682-687.

22. Krisinger MJ, Goebeler V, Lu Z, et al. Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway. *Blood*. 2012;120:1717-1725.
23. Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol*. 2010;185:5628-5636.
24. Lutz HU, Jelezarova E. Complement amplification revisited. *Mol Immunol*. 2006;43:2-12.
25. Rawal N, Pangburn MK. Structure/function of C5 convertases of complement. *Int Immunopharmacol*. 2001;1:415-422.
26. Podack ER, Esser AF, Biesecker G, Muller-Eberhard HJ. Membrane attack complex of complement: a structural analysis of its assembly. *J Exp Med*. 1980;151:301-313.
27. Rambach G, Wurzner R, Speth C. Complement: an efficient sword of innate immunity. *Contrib Microbiol*. 2008;15:78-100.
28. Hugli TE. Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin Immunopathol*. 1984;7:193-219.
29. Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest*. 1970;49:2427-2436.
30. Matthews KW, Mueller-Ortiz SL, Wetsel RA. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol Immunol*. 2004;40:785-793.
31. Klos A, Wende E, Wareham KJ, Monk PN. International Union of Pharmacology. LXXXVII. Complement peptide C5a, C4a, and C3a receptors. *Pharmacol Rev*. 2013;65:500-543.
32. Chen NJ, Mirtsos C, Suh D, et al. C5L2 is critical for the biological activities of the anaphylatoxins C5a and C3a. *Nature*. 2007;446:203-207.
33. Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Kohl J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol*. 2009;46:2753-2766.
34. Tornetta MA, Foley JJ, Sarau HM, Ames RS. The mouse anaphylatoxin C3a receptor: molecular cloning, genomic organization, and functional expression. *J Immunol*. 1997;158:5277-5282.
35. Boulay F, Mery L, Tardif M, Brouchon L, Vignais P. Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry*. 1991;30:2993-2999.
36. Monsinjon T, Gasque P, Chan P, Ischenko A, Brady JJ, Fontaine MC. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *Faseb J*. 2003;17:1003-1014.
37. Laudes IJ, Chu JC, Huber-Lang M, et al. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol*. 2002;169:5962-5970.
38. Nilsson G, Johnell M, Hammer CH, et al. C3a and C5a are chemotaxins for human mast cells and act through distinct receptors via a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *J Immunol*. 1996;157:1693-1698.
39. Schraufstatter IU, Trieu K, Sikora L, Sriramarao P, DiScipio R. Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. *J Immunol*. 2002;169:2102-2110.
40. Schindler R, Gelfand JA, Dinarello CA. Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood*. 1990;76:1631-1638.
41. Fischer WH, Jagels MA, Hugli TE. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a(desArg). *J Immunol*. 1999;162:453-459.
42. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*. 2010;20:34-50.
43. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol*. 2004;164:849-859.
44. Foreman KE, Vaporciyan AA, Bonish BK, et al. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994;94:1147-1155.
45. Fischetti F, Carretta R, Borotto G, et al. Fluvastatin treatment inhibits leucocyte adhesion and extravasation in models of complement-mediated acute inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2004;135:186-193.

46. DiScipio RG, Daffern PJ, Jagels MA, Broide DH, Sriramarao P. A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1999;162:1127-1136.
47. Ikeda K, Nagasawa K, Horiuchi T, Tsuru T, Nishizaka H, Niho Y. C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb Haemost.* 1997;77:394-398.
48. Wojta J, Kaun C, Zorn G, et al. C5a stimulates production of plasminogen activator inhibitor-1 in human mast cells and basophils. *Blood.* 2002;100:517-523.
49. Zhou W. The new face of anaphylatoxins in immune regulation. *Immunobiology.* 2012;217:225-234.
50. Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, et al. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med.* 2003;198:913-923.
51. Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, et al. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet.* 2005;37:835-843.
52. Podack ER. Molecular composition of the tubular structure of the membrane attack complex of complement. *J Biol Chem.* 1984;259:8641-8647.
53. Rus HG, Niculescu FI, Shin ML. Role of the C5b-9 complement complex in cell cycle and apoptosis. *Immunol Rev.* 2001;180:49-55.
54. Carney DF, Hammer CH, Shin ML. Elimination of terminal complement complexes in the plasma membrane of nucleated cells: influence of extracellular Ca²⁺ and association with cellular Ca²⁺. *J Immunol.* 1986;137:263-270.
55. Scolding NJ, Morgan BP, Houston WA, Linington C, Campbell AK, Compston DA. Vesicular removal by oligodendrocytes of membrane attack complexes formed by activated complement. *Nature.* 1989;339:620-622.
56. Carney DF, Lang TJ, Shin ML. Multiple signal messengers generated by terminal complement complexes and their role in terminal complement complex elimination. *J Immunol.* 1990;145:623-629.
57. Triantafilou K, Hughes TR, Triantafilou M, Morgan BP. The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. *J Cell Sci.* 2013;126:2903-2913.
58. Niculescu F, Rus H. Mechanisms of signal transduction activated by sublytic assembly of terminal complement complexes on nucleated cells. *Immunol Res.* 2001;24:191-199.
59. Kilgore KS, Schmid E, Shanley TP, et al. Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor-kappa B activation. *Am J Pathol.* 1997;150:2019-2031.
60. Tedesco F, Pausa M, Nardon E, Introna M, Mantovani A, Dobrina A. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med.* 1997;185:1619-1627.
61. Dobrina A, Pausa M, Fischetti F, et al. Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. *Blood.* 2002;99:185-192.
62. Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem.* 1989;264:9053-9060.
63. Sims PJ, Wiedmer T. Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin Cell Biol.* 1995;6:275-282.
64. Saadi S, Holzknecht RA, Patte CP, Stern DM, Platt JL. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J Exp Med.* 1995;182:1807-1814.
65. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem.* 1988;263:18205-18212.

66. Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem.* 1990;265:3809-3814.
67. Wiedmer T, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase. *Blood.* 1986;68:875-880.
68. Saadi S, Platt JL. Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement. *J Exp Med.* 1995;181:21-31.
69. Fishelson Z, Attali G, Mevorach D. Complement and apoptosis. *Mol Immunol.* 2001;38:207-219.
70. Halperin JA, Taratuska A, Nicholson-Weller A. Terminal complement complex C5b-9 stimulates mitogenesis in 3T3 cells. *J Clin Invest.* 1993;91:1974-1978.
71. Bossi F, Fischetti F, Pellis V, et al. Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. *J Immunol.* 2004;173:6921-6927.
72. Ueda T, Rieu P, Brayer J, Arnaout MA. Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:10680-10684.
73. Dodds AW. Which came first, the lectin/classical pathway or the alternative pathway of complement? *Immunobiology.* 2002;205:340-354.
74. Harboe M, Mollnes TE. The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med.* 2008;12:1074-1084.
75. Alper CA, Johnson AM, Birtch AG, Moore FD. Human C'3: evidence for the liver as the primary site of synthesis. *Science.* 1969;163:286-288.
76. Colten HR, Ooi YM, Edelson PJ. Synthesis and secretion of complement proteins by macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 1979;332:482-490.
77. Whaley K. Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J Exp Med.* 1980;151:501-516.
78. Botto M, Lissandrini D, Sorio C, Walport MJ. Biosynthesis and secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 1992;149:1348-1355.
79. Warren HB, Pantazis P, Davies PF. The third component of complement is transcribed and secreted by cultured human endothelial cells. *Am J Pathol.* 1987;129:9-13.
80. Tang S, Zhou W, Sheerin NS, Vaughan RW, Sacks SH. Contribution of renal secreted complement C3 to the circulating pool in humans. *J Immunol.* 1999;162:4336-4341.
81. Sacks SH, Zhou W, Pani A, Campbell RD, Martin J. Complement C3 gene expression and regulation in human glomerular epithelial cells. *Immunology.* 1993;79:348-354.
82. Sheerin NS, Zhou W, Adler S, Sacks SH. TNF-alpha regulation of C3 gene expression and protein biosynthesis in rat glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* 1997;51:703-710.
83. Sacks S, Zhou W, Campbell RD, Martin J. C3 and C4 gene expression and interferon-gamma-mediated regulation in human glomerular mesangial cells. *Clin Exp Immunol.* 1993;93:411-417.
84. Julen N, Davrinche C, Ozanne D, et al. Differential modulation of complement factor H and C3 expression by TNF-alpha in the rat. In vitro and in vivo studies. *Mol Immunol.* 1992;29:983-988.
85. Moutabarrik A, Nakanishi I, Matsumoto M, Zaid D, Seya T. Human glomerular epithelial cells synthesize and secrete the third component of complement. *Nephron.* 1995;70:55-61.
86. Pratt JR, Abe K, Miyazaki M, Zhou W, Sacks SH. In situ localization of C3 synthesis in experimental acute renal allograft rejection. *Am J Pathol.* 2000;157:825-831.
87. Sheerin NS, Risley P, Abe K, et al. Synthesis of complement protein C3 in the kidney is an important mediator of local tissue injury. *Faseb J.* 2008;22:1065-1072.
88. Sacks SH, Zhou W. Locally produced complement and its role in renal allograft rejection. *Am J Transplant.* 2003;3:927-932.
89. Janssen BJ, Huizinga EG, Raaijmakers HC, et al. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature.* 2005;437:505-511.

90. Law SK, Dodds AW. The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* 1997;6:263-274.
91. Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. The tick-over theory revisited: is C3 a contact-activated protein? *Immunobiology.* 2012;217:1106-1110.
92. Bexborn F, Andersson PO, Chen H, Nilsson B, Ekdahl KN. The tick-over theory revisited: formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H₂O)Bb). *Mol Immunol.* 2008;45:2370-2379.
93. Peerschke EI, Yin W, Grigg SE, Ghebrehiwet B. Blood platelets activate the classical pathway of human complement. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2035-2042.
94. Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, Lopez JA, Afshar-Kharghan V. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. *J Exp Med.* 2005;201:871-879.
95. Polley MJ, Nachman RL. Human platelet activation by C3a and C3a des-arg. *J Exp Med.* 1983;158:603-615.
96. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001;12:261-273.
97. Davis AE, 3rd, Kenney DM. Properdin factor D: effects on thrombin-induced platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1979;64:721-728.
98. Devine DV, Rosse WF. Regulation of the activity of platelet-bound C3 convertase of the alternative pathway of complement by platelet factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:5873-5877.
99. Saggi G, Cortes C, Emch HN, Ramirez G, Worth RG, Ferreira VP. Identification of a Novel Mode of Complement Activation on Stimulated Platelets Mediated by Properdin and C3(H₂O). *J Immunol.* 2013;190:6457-6467.
100. Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998;102:136-144.
101. Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost.* 2007;97:425-434.
102. George JN, Pickett EB, Saucerman S, et al. Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest.* 1986;78:340-348.
103. Yin W, Ghebrehiwet B, Peerschke EI. Expression of complement components and inhibitors on platelet microparticles. *Platelets.* 2008;19:225-233.
104. Mnjoyan Z, Li J, Afshar-Kharghan V. Factor H binds to platelet integrin alphaIIb beta3. *Platelets.* 2008;19:512-519.
105. Vaziri-Sani F, Hellwage J, Zipfel PF, Sjöholm AG, Iancu R, Karpman D. Factor H binds to washed human platelets. *J Thromb Haemost.* 2005;3:154-162.
106. Peerschke EI, Yin W, Ghebrehiwet B. Platelet mediated complement activation. *Adv Exp Med Biol.* 2008;632:81-91.
107. Chenoweth DE. Complement activation in extracorporeal circuits. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;516:306-313.
108. Hed J, Johansson M, Lindroth M. Complement activation according to the alternate pathway by glass and plastic surfaces and its role in neutrophil adhesion. *Immunol Lett.* 1984;8:295-299.
109. Lhotta K, Wurzner R, Kronenberg F, Oppermann M, König P. Rapid activation of the complement system by cuprophane depends on complement component C4. *Kidney Int.* 1998;53:1044-1051.
110. Andersson J, Ekdahl KN, Larsson R, Nilsson UR, Nilsson B. C3 adsorbed to a polymer surface can form an initiating alternative pathway convertase. *J Immunol.* 2002;168:5786-5791.
111. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol.* 2007;44:82-94.

112. Pekna M, Nilsson L, Nilsson-Ekdahl K, Nilsson UR, Nilsson B. Evidence for iC3 generation during cardiopulmonary bypass as the result of blood-gas interaction. *Clin Exp Immunol.* 1993;91:404-409.
113. Cunningham CM, Kingzette M, Richards RL, Alving CR, Lint TF, Gewurz H. Activation of human complement by liposomes: a model for membrane activation of the alternative pathway. *J Immunol.* 1979;122:1237-1242.
114. Comis A, Easterbrook-Smith SB. Inhibition of serum complement haemolytic activity by lipid vesicles containing phosphatidylserine. *FEBS Lett.* 1986;197:321-327.
115. Wang RH, Phillips G, Jr., Medof ME, Mold C. Activation of the alternative complement pathway by exposure of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine on erythrocytes from sickle cell disease patients. *J Clin Invest.* 1993;92:1326-1335.
116. Nolan KF, Reid KB. Complete primary structure of human properdin: a positive regulator of the alternative pathway of the serum complement system. *Biochem Soc Trans.* 1990;18:1161-1162.
117. Pangburn MK. Analysis of the natural polymeric forms of human properdin and their functions in complement activation. *J Immunol.* 1989;142:202-207.
118. Schwaebler W, Dippold WG, Schafer MK, et al. Properdin, a positive regulator of complement activation, is expressed in human T cell lines and peripheral blood T cells. *J Immunol.* 1993;151:2521-2528.
119. Wirthmueller U, Dewald B, Thelen M, et al. Properdin, a positive regulator of complement activation, is released from secondary granules of stimulated peripheral blood neutrophils. *J Immunol.* 1997;158:4444-4451.
120. Hourcade DE. The role of properdin in the assembly of the alternative pathway C3 convertases of complement. *J Biol Chem.* 2006;281:2128-2132.
121. Fearon DT, Austen KF. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med.* 1975;142:856-863.
122. Medicus RG, Gotze O, Muller-Eberhard HJ. Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J Exp Med.* 1976;144:1076-1093.
123. Pangburn MK, Muller-Eberhard HJ. The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochem J.* 1986;235:723-730.
124. Fijen CA, van den Bogaard R, Schipper M, et al. Properdin deficiency: molecular basis and disease association. *Mol Immunol.* 1999;36:863-867.
125. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DE. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol.* 2007;179:2600-2608.
126. Xu W, Berger SP, Trouw LA, et al. Properdin binds to late apoptotic and necrotic cells independently of C3b and regulates alternative pathway complement activation. *J Immunol.* 2008;180:7613-7621.
127. Kemper C, Mitchell LM, Zhang L, Hourcade DE. The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:9023-9028.
128. Camous L, Roumenina L, Bigot S, et al. Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation. *Blood.* 2011;117:1340-1349.
129. Kemper C, Hourcade DE. Properdin: New roles in pattern recognition and target clearance. *Mol Immunol.* 2008;45:4048-4056.
130. Lachmann PJ. The amplification loop of the complement pathways. *Adv Immunol.* 2009;104:115-149.
131. Harboe M, Ulvund G, Vien L, Fung M, Mollnes TE. The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. *Clin Exp Immunol.* 2004;138:439-446.
132. Selander B, Martensson U, Weintraub A, et al. Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J Clin Invest.* 2006;116:1425-1434.

133. Nilsson UR, Mueller-Eberhard HJ. Isolation of Beta If-Globulin from Human Serum and Its Characterization as the Fifth Component of Complement. *J Exp Med.* 1965;122:277-298.
134. Makou E HA, Barlow PN. Functional Anatomy of Complement Factor H. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;52:3949.
135. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortes C. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol.* 2010;47:2187-2197.
136. Carroll MC, Alicot EM, Katzman PJ, Klickstein LB, Smith JA, Fearon DT. Organization of the genes encoding complement receptors type 1 and 2, decay-accelerating factor, and C4-binding protein in the RCA locus on human chromosome 1. *J Exp Med.* 1988;167:1271-1280.
137. Norman DG, Barlow PN, Baron M, Day AJ, Sim RB, Campbell ID. Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J Mol Biol.* 1991;219:717-725.
138. Barlow PN, Norman DG, Steinkasserer A, et al. Solution structure of the fifth repeat of factor H: a second example of the complement control protein module. *Biochemistry.* 1992;31:3626-3634.
139. Hocking HG, Herbert AP, Kavanagh D, et al. Structure of the N-terminal region of complement factor H and conformational implications of disease-linked sequence variations. *J Biol Chem.* 2008;283:9475-9487.
140. Jouvin MH, Kazatchkine MD, Cahour A, Bernard N. Lysine residues, but not carbohydrates, are required for the regulatory function of H on the amplification C3 convertase of complement. *J Immunol.* 1984;133:3250-3254.
141. Brooimans RA, van der Ark AA, Buurman WA, van Es LA, Daha MR. Differential regulation of complement factor H and C3 production in human umbilical vein endothelial cells by IFN-gamma and IL-1. *J Immunol.* 1990;144:3835-3840.
142. Licht C, Pluthero FG, Li L, et al. Platelet-associated complement factor H in healthy persons and patients with atypical HUS. *Blood.* 2009;114:4538-4545.
143. Chen M, Forrester JV, Xu H. Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Exp Eye Res.* 2007;84:635-645.
144. van den Dobbelen ME, Verhasselt V, Kaashoek JG, et al. Regulation of C3 and factor H synthesis of human glomerular mesangial cells by IL-1 and interferon-gamma. *Clin Exp Immunol.* 1994;95:173-180.
145. Weiler JM, Daha MR, Austen KF, Fearon DT. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73:3268-3272.
146. Meri S, Pangburn MK. Discrimination between activators and nonactivators of the alternative pathway of complement: regulation via a sialic acid/polyanion binding site on factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:3982-3986.
147. Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF. Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b. *J Immunol.* 1979;122:75-81.
148. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med.* 1977;146:257-270.
149. Pangburn MK, Muller-Eberhard HJ. Kinetic and thermodynamic analysis of the control of C3b by the complement regulatory proteins factors H and I. *Biochemistry.* 1983;22:178-185.
150. Kuhn S, Zipfel PF. Mapping of the domains required for decay acceleration activity of the human factor H-like protein 1 and factor H. *Eur J Immunol.* 1996;26:2383-2387.
151. Pangburn MK. Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology.* 2000;49:149-157.
152. Blackmore TK, Sadlon TA, Ward HM, Lublin DM, Gordon DL. Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J Immunol.* 1996;157:5422-5427.
153. Blackmore TK, Hellwege J, Sadlon TA, et al. Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J Immunol.* 1998;160:3342-3348.

154. Clark SJ, Ridge LA, Herbert AP, et al. Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions. *J Immunol.* 2013;190:2049-2057.
155. Deban L, Jarva H, Lehtinen MJ, et al. Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J Immunol.* 2008;181:8433-8440.
156. Leffler J, Herbert AP, Norstrom E, et al. Annexin-II, DNA, and histones serve as factor H ligands on the surface of apoptotic cells. *J Biol Chem.* 2010;285:3766-3776.
157. Jarva H, Jokiranta TS, Hellwage J, Zipfel PF, Meri S. Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11. *J Immunol.* 1999;163:3957-3962.
158. Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, et al. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature.* 2011;478:76-81.
159. Shaw PX, Zhang L, Zhang M, et al. Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:13757-13762.
160. Pangburn MK, Rawal N, Cortes C, Alam MN, Ferreira VP, Atkinson MA. Polyanion-induced self-association of complement factor H. *J Immunol.* 2009;182:1061-1068.
161. Khan S, Nan R, Gor J, Mulloy B, Perkins SJ. Bivalent and co-operative binding of complement factor H to heparan sulfate and heparin. *Biochem J.* 2012;444:417-428.
162. Okemefuna AI, Nan R, Gor J, Perkins SJ. Electrostatic interactions contribute to the folded-back conformation of wild type human factor H. *J Mol Biol.* 2009;391:98-118.
163. Zipfel PF, Skerka C. FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today.* 1999;20:135-140.
164. Kuhn S, Skerka C, Zipfel PF. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol.* 1995;155:5663-5670.
165. Skerka C, et al. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol.* 2013. (*in press*)
166. Heinen S, Hartmann A, Lauer N, et al. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood.* 2009;114:2439-2447.
167. Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, et al. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mol Genet.* 2010;19:4694-4704.
168. Hellwage J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett.* 1999;462:345-352.
169. McRae JL, Duthy TG, Griggs KM, et al. Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *J Immunol.* 2005;174:6250-6256.
170. Nilsson SC, Sim RB, Lea SM, Fremeaux-Bacchi V, Blom AM. Complement factor I in health and disease. *Mol Immunol.* 2011;48:1611-1620.
171. Julen N, Dauchel H, Lemerrier C, Sim RB, Fontaine M, Ripoché J. In vitro biosynthesis of complement factor I by human endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1992;22:213-217.
172. Timar KK, Pasch MC, van den Bosch NH, et al. Human keratinocytes produce the complement inhibitor factor H: synthesis is regulated by interferon-gamma. *Mol Immunol.* 2006;43:317-325.
173. Scharfstein J, Ferreira A, Gigli I, Nussenzweig V. Human C4-binding protein. I. Isolation and characterization. *J Exp Med.* 1978;148:207-222.
174. Gigli I, Fujita T, Nussenzweig V. Modulation of the classical pathway C3 convertase by plasma proteins C4 binding protein and C3b inactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:6596-6600.
175. Blom AM, Kask L, Dahlback B. CCP1-4 of the C4b-binding protein alpha-chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b. *Mol Immunol.* 2003;39:547-556.
176. Johnstone RW, Loveland BE, McKenzie IF. Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal human tissues. *Immunology.* 1993;79:341-347.

177. Hourcade D, Liszewski MK, Krych-Goldberg M, Atkinson JP. Functional domains, structural variations and pathogen interactions of MCP, DAF and CR1. *Immunopharmacology*. 2000;49:103-116.
178. Kim DD, Song WC. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*. 2006;118:127-136.
179. Li SH, Szmítko PE, Weisel RD, et al. C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation*. 2004;109:833-836.
180. Barilla-LaBarca ML, Liszewski MK, Lambris JD, Hourcade D, Atkinson JP. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol*. 2002;168:6298-6304.
181. Liszewski MK, Leung M, Cui W, et al. Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor protein (MCP; CD46). *J Biol Chem*. 2000;275:37692-37701.
182. Cardone J, Le Friec G, Kemper C. CD46 in innate and adaptive immunity: an update. *Clin Exp Immunol*. 2011;164:301-311.
183. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:35-58.
184. Brodbeck WG, Liu D, Sperry J, Mold C, Medof ME. Localization of classical and alternative pathway regulatory activity within the decay-accelerating factor. *J Immunol*. 1996;156:2528-2533.
185. Tsuji S, Kaji K, Nagasawa S. Decay-accelerating factor on human umbilical vein endothelial cells. Its histamine-induced expression and spontaneous rapid shedding from the cell surface. *J Immunol*. 1994;152:1404-1410.
186. Mason JC, Yarwood H, Sugars K, Morgan BP, Davies KA, Haskard DO. Induction of decay-accelerating factor by cytokines or the membrane-attack complex protects vascular endothelial cells against complement deposition. *Blood*. 1999;94:1673-1682.
187. Mason JC, Lidington EA, Ahmad SR, Haskard DO. bFGF and VEGF synergistically enhance endothelial cytoprotection via decay-accelerating factor induction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:C578-587.
188. Kinderlerer AR, Pombo Gregoire I, Hamdulay SS, et al. Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin. *Blood*. 2009;113:1598-1607.
189. Mason JC, Lidington EA, Yarwood H, Lublin DM, Haskard DO. Induction of endothelial cell decay-accelerating factor by vascular endothelial growth factor: a mechanism for cytoprotection against complement-mediated injury during inflammatory angiogenesis. *Arthritis Rheum*. 2001;44:138-150.
190. Lidington EA, Haskard DO, Mason JC. Induction of decay-accelerating factor by thrombin through a protease-activated receptor 1 and protein kinase C-dependent pathway protects vascular endothelial cells from complement-mediated injury. *Blood*. 2000;96:2784-2792.
191. Heeger PS, Lalli PN, Lin F, et al. Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J Exp Med*. 2005;201:1523-1530.
192. Pham T, Kaul A, Hart A, et al. dra-related X adhesins of gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* recognize SCR-3 and SCR-4 domains of recombinant decay-accelerating factor. *Infect Immun*. 1995;63:1663-1668.
193. Fearon DT. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte. *J Exp Med*. 1980;152:20-30.
194. Gelfand MC, Frank MM, Green I. A receptor for the third component of complement in the human renal glomerulus. *J Exp Med*. 1975;142:1029-1034.
195. Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, et al. Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2009;114:2837-2845.

196. Ross GD, Lambris JD, Cain JA, Newman SL. Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J Immunol.* 1982;129:2051-2060.
197. Iida K, Nussenzweig V. Complement receptor is an inhibitor of the complement cascade. *J Exp Med.* 1981;153:1138-1150.
198. Medof ME, Iida K, Mold C, Nussenzweig V. Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med.* 1982;156:1739-1754.
199. Reinagel ML, Gezen M, Ferguson PJ, Kuhn S, Martin EN, Taylor RP. The primate erythrocyte complement receptor (CR1) as a privileged site: binding of immunoglobulin G to erythrocyte CR1 does not target erythrocytes for phagocytosis. *Blood.* 1997;89:1068-1077.
200. Meri S, Waldmann H, Lachmann PJ. Distribution of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues. *Lab Invest.* 1991;65:532-537.
201. Rollins SA, Sims PJ. The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J Immunol.* 1990;144:3478-3483.
202. Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, et al. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol.* 2002;539:537-545.
203. Merry AH, Rawlinson VI, Uchikawa M, Daha MR, Sim RB. Studies on the sensitivity to complement-mediated lysis of erythrocytes (Inab phenotype) with a deficiency of DAF (decay accelerating factor). *Br J Haematol.* 1989;73:248-253.
204. Reid ME, Mallinson G, Sim RB, et al. Biochemical studies on red blood cells from a patient with the Inab phenotype (decay-accelerating factor deficiency). *Blood.* 1991;78:3291-3297.
205. Motoyama N, Okada N, Yamashina M, Okada H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria due to hereditary nucleotide deletion in the HRF20 (CD59) gene. *Eur J Immunol.* 1992;22:2669-2673.
206. Kimberley FC, Sivasankar B, Paul Morgan B. Alternative roles for CD59. *Mol Immunol.* 2007;44:73-81.
207. Holers VM. The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases. *Immunol Rev.* 2008;223:300-316.
208. Zuber J, Fakhouri F, Roumenina LT, Loirat C, Fremeaux-Bacchi V. Use of eculizumab for atypical haemolytic uraemic syndrome and C3 glomerulopathies. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8:643-657.
209. Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. [Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1955;85:905-909.
210. Habib R, Mathieu H, Royer P. [Arteriole-capillary thrombotic disease of the kidney in children]. *Rev Fr Etud Clin Biol.* 1958;3:891-894.
211. Noel LH. Atlas de pathologie rénale 2008:p.427-461
212. Moake JL. Thrombotic microangiopathies. *N Engl J Med.* 2002;347:589-600.
213. Noris M, Remuzzi G. Atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2009;361:1676-1687.
214. Besbas N, Karpman D, Landau D, et al. A classification of hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura and related disorders. *Kidney Int.* 2006;70:423-431.
215. Barbour T, Johnson S, Cohn S, Hughes P. Thrombotic microangiopathy and associated renal disorders. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27:2673-2685.
216. Fremeaux-Bacchi V, Fakhouri F, Garnier A, et al. Genetics and outcome of atypical hemolytic uremic syndrome: a nationwide French series comparing children and adults. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8:554-562.
217. Dolislager D, Tune B. The hemolytic-uremic syndrome: spectrum of severity and significance of prodrome. *Am J Dis Child.* 1978;132:55-58.
218. Kaplan BS, Chesney RW, Drummond KN. Hemolytic uremic syndrome in families. *N Engl J Med.* 1975;292:1090-1093.
219. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* 1983;1:619-620.

220. Cameron JS, Vick R. Letter: Plasma-C3 in haemolytic-uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet*. 1973;2:975.
221. Kaplan BS, Thomson PD, MacNab GM. Letter: Serum-complement levels in haemolytic-uraemic syndrome. *Lancet*. 1973;2:1505-1506.
222. Kim Y, Miller K, Michael AF. Breakdown products of C3 and factor B in hemolytic-uremic syndrome. *J Lab Clin Med*. 1977;89:845-850.
223. Thompson RA, Winterborn MH. Hypocomplementaemia due to a genetic deficiency of beta 1H globulin. *Clin Exp Immunol*. 1981;46:110-119.
224. Carreras L, Romero R, Requesens C, et al. Familial hypocomplementemic hemolytic uremic syndrome with HLA-A3,B7 haplotype. *Jama*. 1981;245:602-604.
225. Rougier N, Kazatchkine MD, Rougier JP, et al. Human complement factor H deficiency associated with hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:2318-2326.
226. Warwicker P, Goodship TH, Donne RL, et al. Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. 1998;53:836-844.
227. Richards A, Kemp EJ, Liszewski MK, et al. Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12966-12971.
228. Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, Blouin J, et al. Complement factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet*. 2004;41:e84.
229. Goicoechea E. Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:240-245.
230. Fremeaux-Bacchi V, Miller EC, Liszewski MK, et al. Mutations in complement C3 predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2008;112:4948-4952.
231. Delvaeye M, Noris M, De Vriese A, et al. Thrombomodulin mutations in atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2009;361:345-357.
232. Lemaire M, Fremeaux-Bacchi V, Schaefer F, et al. Recessive mutations in DGKE cause atypical hemolytic-uremic syndrome. *Nat Genet*. 2013;45:531-536.
233. Maga TK, Nishimura CJ, Weaver AE, Frees KL, Smith RJ. Mutations in alternative pathway complement proteins in American patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Hum Mutat*. 2010;31:E1445-1460.
234. Bu F, Borsa N, Gianluigi A, Smith RJ. Familial atypical hemolytic uremic syndrome: a review of its genetic and clinical aspects. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:370426.
235. Pirson Y, Lefebvre C, Arnout C, van Ypersele de Strihou C. Hemolytic uremic syndrome in three adult siblings: a familial study and evolution. *Clin Nephrol*. 1987;28:250-255.
236. Petermann A, Offermann G, Distler A, Sharma AM. Familial hemolytic-uremic syndrome in three generations. *Am J Kidney Dis*. 1998;32:1063-1067.
237. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, et al. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 2006;108:1267-1279.
238. Sellier-Leclerc AL, Fremeaux-Bacchi V, Dragon-Durey MA, et al. Differential impact of complement mutations on clinical characteristics in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:2392-2400.
239. Noris M, Caprioli J, Bresin E, et al. Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5:1844-1859.
240. Neuhaus TJ, Calonder S, Leumann EP. Heterogeneity of atypical haemolytic uraemic syndromes. *Arch Dis Child*. 1997;76:518-521.
241. Eckart P, Guillot M, Jokic M, et al. [Cardiac involvement during classic hemolytic uremic syndrome]. *Arch Pediatr*. 1999;6:430-433.
242. Poulton J, Taylor CM, De Giovanni JV. Dilated cardiomyopathy associated with haemolytic uraemic syndrome. *Br Heart J*. 1987;57:181-183.
243. Gallo EG, Gianantonio CA. Extrarenal involvement in diarrhoea-associated haemolytic-uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1995;9:117-119.

244. Askiti V, Hendrickson K, Fish AJ, Braunlin E, Sinaiko AR. Troponin I levels in a hemolytic uremic syndrome patient with severe cardiac failure. *Pediatr Nephrol.* 2004;19:345-348.
245. Gaddam S, Pablani L, Chainani V, et al. Complete recovery of ischemic cardiomyopathy from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Clin Med Insights Cardiol.* 2011;5:29-33.
246. Oakes RS, Siegler RL, McReynolds MA, Pysher T, Pavia AT. Predictors of fatality in postdiarrheal hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics.* 2006;117:1656-1662.
247. Constantinescu AR, Bitzan M, Weiss LS, et al. Non-enteropathic hemolytic uremic syndrome: causes and short-term course. *Am J Kidney Dis.* 2004;43:976-982.
248. Bresin E, Daina E, Noris M, et al. Outcome of renal transplantation in patients with non-Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: prognostic significance of genetic background. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1:88-99.
249. Nurnberger J, Philipp T, Witzke O, et al. Eculizumab for atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2009;360:542-544.
250. Gruppo RA, Rother RP. Eculizumab for congenital atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2009;360:544-546.
251. Malina M, Gulati A, Bagga A, Majid MA, Simkova E, Schaefer F. Peripheral gangrene in children with atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics.* 2013;131:e331-335.
252. Gulleroglu K, Fidan K, Hancer VS, Bayrakci U, Baskin E, Soylemezoglu O. Neurologic involvement in atypical hemolytic uremic syndrome and successful treatment with eculizumab. *Pediatr Nephrol.* 2013;28:827-830.
253. Vilalta R, Lara E, Madrid A, et al. Long-term eculizumab improves clinical outcomes in atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2012;27:2323-2326.
254. Saunders RE, Goodship TH, Zipfel PF, Perkins SJ. An interactive web database of factor H-associated hemolytic uremic syndrome mutations: insights into the structural consequences of disease-associated mutations. *Hum Mutat.* 2006;27:21-30.
255. Neumann HP, Salzmann M, Bohnert-Iwan B, et al. Haemolytic uraemic syndrome and mutations of the factor H gene: a registry-based study of German speaking countries. *J Med Genet.* 2003;40:676-681.
256. Pickering MC, de Jorge EG, Martinez-Barricarte R, et al. Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains. *J Exp Med.* 2007;204:1249-1256.
257. Jozsi M, Heinen S, Hartmann A, et al. Factor H and atypical hemolytic uremic syndrome: mutations in the C-terminus cause structural changes and defective recognition functions. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:170-177.
258. Richards A, Buddles MR, Donne RL, et al. Factor H mutations in hemolytic uremic syndrome cluster in exons 18-20, a domain important for host cell recognition. *Am J Hum Genet.* 2001;68:485-490.
259. Ferreira VP, Herbert AP, Cortes C, et al. The binding of factor H to a complex of physiological polyanions and C3b on cells is impaired in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Immunol.* 2009;182:7009-7018.
260. Jokiranta TS, Jaakola VP, Lehtinen MJ, Parepalo M, Meri S, Goldman A. Structure of complement factor H carboxyl-terminus reveals molecular basis of atypical haemolytic uremic syndrome. *Embo J.* 2006;25:1784-1794.
261. Sanchez-Corral P, Perez-Caballero D, Huarte O, et al. Structural and functional characterization of factor H mutations associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002;71:1285-1295.
262. Heinen S, Jozsi M, Hartmann A, et al. Hemolytic uremic syndrome: a factor H mutation (E1172Stop) causes defective complement control at the surface of endothelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:506-514.
263. Lehtinen MJ, Rops AL, Isenman DE, van der Vlag J, Jokiranta TS. Mutations of factor H impair regulation of surface-bound C3b by three mechanisms in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Biol Chem.* 2009;284:15650-15658.

264. Sanchez-Corral P, Gonzalez-Rubio C, Rodriguez de Cordoba S, Lopez-Trascasa M. Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol Immunol.* 2004;41:81-84.
265. Roumenina LT, Loirat C, Dragon-Durey MA, Halbwachs-Mecarelli L, Sautes-Fridman C, Fremeaux-Bacchi V. Alternative complement pathway assessment in patients with atypical HUS. *J Immunol Methods.* 2011;365:8-26.
266. Zipfel PF, Edey M, Heinen S, et al. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet.* 2007;3:e41.
267. Dragon-Durey MA, Blanc C, Marliot F, et al. The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet.* 2009;46:447-450.
268. Venables JP, Strain L, Routledge D, et al. Atypical haemolytic uraemic syndrome associated with a hybrid complement gene. *PLoS Med.* 2006;3:e431.
269. Francis NJ, McNicholas B, Awan A, et al. A novel hybrid CFH/CFHR3 gene generated by a microhomology-mediated deletion in familial atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2012;119:591-601.
270. Fremeaux-Bacchi V, Strain L, Beury D, et al. High prevalence of hybrid genes involving CFH and CFHR1 in atypical Hemolytic Uremic Syndrome. *Molecular immunology.* 2011;48:1666.
271. Monteferrante G, Brioschi S, Caprioli J, et al. Genetic analysis of the complement factor H related 5 gene in haemolytic uraemic syndrome. *Mol Immunol.* 2007;44:1704-1708.
272. Westra D, Vernon KA, Volokhina EB, Pickering MC, van de Kar NC, van den Heuvel LP. Atypical hemolytic uremic syndrome and genetic aberrations in the complement factor H-related 5 gene. *J Hum Genet.* 2012;57:459-464.
273. Le Quintrec M, Zuber J, Moulin B, et al. Complement genes strongly predict recurrence and graft outcome in adult renal transplant recipients with atypical hemolytic and uremic syndrome. *Am J Transplant.* 2013;13:663-675.
274. Noris M, Brioschi S, Caprioli J, et al. Familial haemolytic uraemic syndrome and an MCP mutation. *Lancet.* 2003;362:1542-1547.
275. Kavanagh D, Kemp EJ, Mayland E, et al. Mutations in complement factor I predispose to development of atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:2150-2155.
276. Bienaime F, Dragon-Durey MA, Regnier CH, et al. Mutations in components of complement influence the outcome of Factor I-associated atypical hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 2009;77:339-349.
277. Roumenina LT, Frimat M, Miller EC, et al. A prevalent C3 mutation in aHUS patients causes a direct C3 convertase gain of function. *Blood.* 2012;119:4182-4191.
278. Sartz L, Olin AI, Kristoffersson AC, et al. A novel C3 mutation causing increased formation of the C3 convertase in familial atypical hemolytic uremic syndrome. *J Immunol.* 2012;188:2030-2037.
279. Volokhina E, Westra D, Xue X, Gros P, van de Kar N, van den Heuvel L. Novel C3 mutation p.Lys65Gln in aHUS affects complement factor H binding. *Pediatr Nephrol.* 2012;27:1519-1524.
280. Fremeaux-Bacchi V, Kemp EJ, Goodship JA, et al. The development of atypical haemolytic-uraemic syndrome is influenced by susceptibility factors in factor H and membrane cofactor protein: evidence from two independent cohorts. *J Med Genet.* 2005;42:852-856.
281. Caprioli J, Castelletti F, Bucchioni S, et al. Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease. *Hum Mol Genet.* 2003;12:3385-3395.
282. Blom AM, Bergstrom F, Edey M, et al. A novel non-synonymous polymorphism (p.Arg240His) in C4b-binding protein is associated with atypical hemolytic uremic syndrome and leads to impaired alternative pathway cofactor activity. *J Immunol.* 2008;180:6385-6391.
283. Harris CL, Heurich M, Rodriguez de Cordoba S, Morgan BP. The complement: dictating risk for inflammation and infection. *Trends Immunol.* 2012;33:513-521.
284. Bresin E, Rurali E, Caprioli J, et al. Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24:475-486.

285. Martinez-Barricarte R, Pianetti G, Gautard R, et al. The complement factor H R1210C mutation is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:639-646.
286. Dragon-Durey MA, Loirat C, Cloarec S, et al. Anti-Factor H autoantibodies associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:555-563.
287. Jozsi M, Licht C, Strobel S, et al. Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency. *Blood.* 2008;111:1512-1514.
288. Jozsi M, Strobel S, Dahse HM, et al. Anti factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2007;110:1516-1518.
289. Blanc C, Roumenina LT, Ashraf Y, et al. Overall neutralization of complement factor H by autoantibodies in the acute phase of the autoimmune form of atypical hemolytic uremic syndrome. *J Immunol.* 2012;189:3528-3537.
290. Kopp A, Strobel S, Tortajada A, et al. Atypical hemolytic uremic syndrome-associated variants and autoantibodies impair binding of factor h and factor h-related protein 1 to pentraxin 3. *J Immunol.* 2012;189:1858-1867.
291. Dragon-Durey MA, Sethi SK, Bagga A, et al. Clinical features of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:2180-2187.
292. Kavanagh D, Pappworth IY, Anderson H, et al. Factor I autoantibodies in patients with atypical hemolytic uremic syndrome: disease-associated or an epiphenomenon? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7:417-426.
293. Strobel S, Zimmering M, Papp K, Prechl J, Jozsi M. Anti-factor B autoantibody in dense deposit disease. *Mol Immunol.* 2010;47:1476-1483.
294. Chen Q, Muller D, Rudolph B, et al. Combined C3b and factor B autoantibodies and MPGN type II. *N Engl J Med.* 2011;365:2340-2342.
295. Le Quintrec M, Lionet A, Kamar N, et al. Complement mutation-associated de novo thrombotic microangiopathy following kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2008;8:1694-1701.
296. Fakhouri F, Roumenina L, Provot F, et al. Pregnancy-associated hemolytic uremic syndrome revisited in the era of complement gene mutations. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:859-867.
297. Derzsy Z, Prohaszka Z, Rigo J, Jr., Fust G, Molvarec A. Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol;*47:1500-1506.
298. Girardi G. Complement inhibition keeps mothers calm and avoids fetal rejection. *Immunol Invest.* 2008;37:645-659.
299. Goldberg M, Luknar-Gabor N, Keidar R, Katz Y. Synthesis of complement proteins in the human chorion is differentially regulated by cytokines. *Mol Immunol.* 2007;44:1737-1742.
300. Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood.* 2001;98:2730-2735.
301. McLean KC, Bernstein IM, Brummel-Ziedins KE. Tissue factor-dependent thrombin generation across pregnancy. *Am J Obstet Gynecol;*207:135 e131-136.
302. Strevens H, Wide-Svensson D, Hansen A, et al. Glomerular endotheliosis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Bjog.* 2003;110:831-836.
303. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 2005;365:1073-1086.
304. Noris M, Remuzzi G. Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:1035-1050.
305. Thorpe CM. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Infect Dis.* 2004;38:1298-1303.
306. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:603-609.
307. Scheiring J, Rosales A, Zimmerhackl LB. Clinical practice. Today's understanding of the haemolytic uraemic syndrome. *Eur J Pediatr.* 2010;169:7-13.
308. Garg AX, Suri RS, Barrowman N, et al. Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Jama.* 2003;290:1360-1370.
309. Spinale J, Ruebner R, Copelovitch L, Kaplan B. Long-term outcomes of Shiga toxin hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2013.

310. Frank C, Werber D, Cramer JP, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*. 2011;365:1771-1780.
311. Magnus T, Rother J, Simova O, et al. The neurological syndrome in adults during the 2011 northern German *E. coli* serotype O104:H4 outbreak. *Brain*. 2012;135:1850-1859.
312. Gerber A, Karch H, Allerberger F, Verweyen HM, Zimmerhackl LB. Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J Infect Dis*. 2002;186:493-500.
313. Karch H, Denamur E, Dobrindt U, et al. The enemy within us: lessons from the 2011 European *Escherichia coli* O104:H4 outbreak. *EMBO Mol Med*. 2011;4:841-848.
314. Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1977;18:775-779.
315. O'Brien AD, LaVeck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 1982;146:763-769.
316. Louise CB, Obrig TG. Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis*. 1995;172:1397-1401.
317. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*. 1999;37:497-503.
318. Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, et al. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest*. 1993;92:1412-1417.
319. Acheson DW, Moore R, De Breucker S, et al. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun*. 1996;64:3294-3300.
320. te Loo DM, Monnens LA, van Der Velden TJ, et al. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2000;95:3396-3402.
321. Bitzan M, Richardson S, Huang C, Boyd B, Petric M, Karmali MA. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. *Infect Immun*. 1994;62:3337-3347.
322. Ghosh SA, Polanowska-Grabowska RK, Fujii J, Obrig T, Gear AR. Shiga toxin binds to activated platelets. *J Thromb Haemost*. 2004;2:499-506.
323. Griener TP, Mulvey GL, Marcato P, Armstrong GD. Differential binding of Shiga toxin 2 to human and murine neutrophils. *J Med Microbiol*. 2007;56:1423-1430.
324. Lingwood CA, Law H, Richardson S, et al. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem*. 1987;262:8834-8839.
325. Zumbun SD, Hanson L, Sinclair JF, et al. Human intestinal tissue and cultured colonic cells contain globotriaosylceramide synthase mRNA and the alternate Shiga toxin receptor globotetraosylceramide. *Infect Immun*. 2010;78:4488-4499.
326. Lea N, Lord JM, Roberts LM. Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiology*. 1999;145 (Pt 5):999-1004.
327. Petruzzello-Pellegrini TN, Yuen DA, Page AV, et al. The CXCR4/CXCR7/SDF-1 pathway contributes to the pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome in humans and mice. *J Clin Invest*. 2012;122:759-776.
328. Morigi M, Galbusera M, Binda E, et al. Verotoxin-1-induced up-regulation of adhesive molecules renders microvascular endothelial cells thrombogenic at high shear stress. *Blood*. 2001;98:1828-1835.
329. Zoja C, Buelli S, Morigi M. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr Nephrol*. 2010;25:2231-2240.
330. Erwert RD, Eiting KT, Tupper JC, Winn RK, Harlan JM, Bannerman DD. Shiga toxin induces decreased expression of the anti-apoptotic protein Mcl-1 concomitant with the onset of endothelial apoptosis. *Microb Pathog*. 2003;35:87-93.

331. Nestoridi E, Tsukurov O, Kushak RI, Ingelfinger JR, Grabowski EF. Shiga toxin enhances functional tissue factor on human glomerular endothelial cells: implications for the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome. *J Thromb Haemost.* 2005;3:752-762.
332. Karpman D, Papadopoulou D, Nilsson K, Sjogren AC, Mikaelsson C, Lethagen S. Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2001;97:3100-3108.
333. Nolasco LH, Turner NA, Bernardo A, et al. Hemolytic uremic syndrome-associated Shiga toxins promote endothelial-cell secretion and impair ADAMTS13 cleavage of unusually large von Willebrand factor multimers. *Blood.* 2005;106:4199-4209.
334. Monnens L, Molenaar J, Lambert PH, Proesmans W, van Munster P. The complement system in hemolytic-uremic syndrome in childhood. *Clin Nephrol.* 1980;13:168-171.
335. Robson WL, Leung AK, Fick GH, McKenna AI. Hypocomplementemia and leukocytosis in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Nephron.* 1992;62:296-299.
336. Thurman JM, Marians R, Emlen W, et al. Alternative pathway of complement in children with diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:1920-1924.
337. Orth D, Khan AB, Naim A, et al. Shiga toxin activates complement and binds factor H: evidence for an active role of complement in hemolytic uremic syndrome. *J Immunol.* 2009;182:6394-6400.
338. Morigi M, Galbusera M, Gastoldi S, et al. Alternative pathway activation of complement by Shiga toxin promotes exuberant C3a formation that triggers microvascular thrombosis. *J Immunol.* 2011;187:172-180.
339. Fernandez GC, Te Loo MW, van der Velden TJ, van der Heuvel LP, Palermo MS, Monnens LL. Decrease of thrombomodulin contributes to the procoagulant state of endothelium in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2003;18:1066-1068.
340. Lapeyraque AL, Malina M, Fremeaux-Bacchi V, et al. Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N Engl J Med.* 2011;364:2561-2563.
341. Kilstein J, Beutel G et al. Best supportive care and therapeutic plasma exchange with or without eculizumab in Shx-producing *E. coli* O104:H4 induced HUS: an analysis of the German STEC-HUS registry. *Nephrol Dial Transp.* 2012;27:3807
342. Menne J, Nitschke M, Stingele R, et al. Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case-control study. *Bmj.* 2012;345:e4565.
343. Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1253:16-36.
344. Fearon DT. Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:1971-1975.
345. Pangburn MK, Muller-Eberhard HJ. Complement C3 convertase: cell surface restriction of beta1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:2416-2420.
346. Jokiranta TS, Cheng ZZ, Seeberger H, et al. Binding of complement factor H to endothelial cells is mediated by the carboxy-terminal glycosaminoglycan binding site. *Am J Pathol.* 2005;167:1173-1181.
347. Cioffi DL, Pandey S, Alvarez DF, Cioffi EA. Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302:L1067-1077.
348. Salmon AH, Satchell SC. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *J Pathol.* 2012;226:562-574.
349. Lofling JC, Paton AW, Varki NM, Paton JC, Varki A. A dietary non-human sialic acid may facilitate hemolytic-uremic syndrome. *Kidney Int.* 2009;76:140-144.
350. Fischer K, Poschmann A, Oster H. [Severe pneumonia with hemolysis caused by neuraminidase. Detection of cryptantigens by indirect immunofluorescent technic]. *Monatsschr Kinderheilkd.* 1971;119:2-8.

351. Copelovitch L, Kaplan BS. Streptococcus pneumoniae--associated hemolytic uremic syndrome: classification and the emergence of serotype 19A. *Pediatrics*. 2010;125:e174-182.
352. Waters AM, Kerecuk L, Luk D, et al. Hemolytic uremic syndrome associated with invasive pneumococcal disease: the United Kingdom experience. *J Pediatr*. 2007;151:140-144.
353. Cabrera GR, Fortenberry JD, Warshaw BL, Chambliss CR, Butler JC, Cooperstone BG. Hemolytic uremic syndrome associated with invasive Streptococcus pneumoniae infection. *Pediatrics*. 1998;101:699-703.
354. Kaplan SL, Mason EO, Jr., Barson WJ, et al. Three-year multicenter surveillance of systemic pneumococcal infections in children. *Pediatrics*. 1998;102:538-545.
355. Spinale JM, Ruebner RL, Kaplan BS, Copelovitch L. Update on Streptococcus pneumoniae associated hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Pediatr*. 2013;25:203-208.
356. Copelovitch L, Kaplan BS. Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2008;23:1951-1956.
357. Banerjee R, Hersh AL, Newland J, et al. Streptococcus pneumoniae-associated hemolytic uremic syndrome among children in North America. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30:736-739.
358. Coats MT, Murphy T, Paton JC, Gray B, Briles DE. Exposure of Thomsen-Friedenreich antigen in Streptococcus pneumoniae infection is dependent on pneumococcal neuraminidase A. *Microb Pathog*. 2011;50:343-349.
359. Klein PJ, Bulla M, Newman RA, et al. Thomsen-Friedenreich antigen in haemolytic-uraemic syndrome. *Lancet*. 1977;2:1024-1025.
360. Novak RW, Martin CR, Orsini EN. Hemolytic-uremic syndrome and T-cryptantigen exposure by neuraminidase-producing pneumococci: an emerging problem? *Pediatr Pathol*. 1983;1:409-413.
361. Petersen VP, Olsen TS. Late renal transplant failure due to the hemolytic-uremic syndrome. *Acta Med Scand*. 1971;189:377-380.
362. Allen U, Licht C. Pandemic H1N1 influenza A infection and (atypical) HUS--more than just another trigger? *Pediatr Nephrol*;26:3-5.
363. Tobe TJ, Franssen CF, Zijlstra JG, de Jong PE, Stegeman CA. Hemolytic uremic syndrome due to Capnocytophaga canimorsus bacteremia after a dog bite. *Am J Kidney Dis*. 1999;33:e5.
364. Mulder AH, Gerlag PG, Verhoef LH, van den Wall Bake AW. Hemolytic uremic syndrome after capnocytophaga canimorsus (DF-2) septicemia. *Clin Nephrol*. 2001;55:167-170.
365. Ma A, Goetz MB. Capnocytophaga canimorsus sepsis with associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Med Sci*. 2013;345:78-80.
366. Geary DF. Hemolytic uremic syndrome and streptococcus pneumoniae: improving our understanding. *J Pediatr*. 2007;151:113-114.
367. Crookston KP, Reiner AP, Cooper LJ, Sacher RA, Blajchman MA, Heddle NM. RBC T activation and hemolysis: implications for pediatric transfusion management. *Transfusion*. 2000;40:801-812.
368. Jarva H, Hellwage J, Jokiranta TS, Lehtinen MJ, Zipfel PF, Meri S. The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. *J Immunol*. 2004;172:3111-3118.
369. Lu L, Ma Z, Jokiranta TS, Whitney AR, DeLeo FR, Zhang JR. Species-specific interaction of Streptococcus pneumoniae with human complement factor H. *J Immunol*. 2008;181:7138-7146.
370. Szilágyi A, Kiss N, Bereczki C, Tálosi G. The role of complement in Streptococcus pneumoniae-associated haemolytic uraemic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2013.(in press)
371. Kerr H, Richards A. Complement-mediated injury and protection of endothelium: lessons from atypical haemolytic uraemic syndrome. *Immunobiology*. 2012;217:195-203.
372. Dent JA, Galbusera M, Ruggeri ZM. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest*. 1991;88:774-782.
373. 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;307:1432-1435.
374. Moschcowitz E. Paul Klemperer; an appreciation. *J Mt Sinai Hosp N Y*. 1957;24:648-654.

375. Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*. 1996;87:4235-4244.
376. Furlan M, Robles R, Lammle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood*. 1996;87:4223-4234.
377. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Lammle B. Deficient activity of von Willebrand factor-cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1997;89:3097-3103.
378. Tsai HM, Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*. 1998;339:1585-1594.
379. 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.
380. Feys HB, Roodt J, Vandeputte N, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura directly linked with ADAMTS13 inhibition in the baboon (*Papio ursinus*). *Blood*. 2010;116:2005-2010.
381. Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, et al. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest*. 2005;115:2752-2761.
382. Moatti-Cohen M, Garrec C, Wolf M, et al. Unexpected frequency of Upshaw-Schulman syndrome in pregnancy-onset thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2012;119:5888-5897.
383. Morgand. 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*. 2013.
384. Vesely SK, George JN, Lammle B, et al. ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. *Blood*. 2003;102:60-68.
385. 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;98:1765-1772.
386. Reti M, Farkas P, Csuka D, et al. Complement activation in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2012;10:791-798.
387. Ruiz-Torres MP, Casiraghi F, Galbusera M, et al. Complement activation: the missing link between ADAMTS-13 deficiency and microvascular thrombosis of thrombotic microangiopathies. *Thromb Haemost*. 2005;93:443-452.
388. Chapin J, Weksler B, Magro C, Laurence J. Eculizumab in the treatment of refractory idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2013;157:772-774.
389. Park Y, Hay S et al. Is it Quinine TTP/HUS or Quinine TMA? ADAMTS13 Levels and Implications for Therapy. 2009. *Journal of Clinical Apheresis* 24:115–119.
390. Medina PJ, Sipols JM, George JN. Drug-associated thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:286-293.
391. Niaudet P, Gagnadoux MF, Broyer M, Salomon R. Hemolytic-uremic syndrome: hereditary forms and forms associated with hereditary diseases. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 2000;30:261-280.
392. Andres E, Affenberger S, Zimmer J, et al. Current hematological findings in cobalamin deficiency. A study of 201 consecutive patients with documented cobalamin deficiency. *Clin Lab Haematol*. 2006;28:50-56.
393. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*. 2008;358:1129-1136.
394. Sartelet H, Toupance O, Lorenzato M, et al. Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy is associated with decreased expression of vascular endothelial growth factor in kidneys. *Am J Transplant*. 2005;5:2441-2447.
395. Kim YG, Suga SI, Kang DH, et al. Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovery in experimental thrombotic microangiopathy. *Kidney Int*. 2000;58:2390-2399.
396. Suga S, Kim YG, Joly A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF121) protects rats from renal infarction in thrombotic microangiopathy. *Kidney Int*. 2001;60:1297-1308.

397. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007;100:158-173.
398. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol.* 2007;178:6017-6022.
399. van Hinsbergh VW. Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34:93-106.
400. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays.* 1994;16:901-906.
401. Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, et al. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:10623-10628.
402. Wolinsky H. A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ Res.* 1980;47:301-311.
403. Rabelink TJ, de Boer HC, van Zonneveld AJ. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6:404-414.
404. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:261-270.
405. McDonald DM, Thurston G, Baluk P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. *Microcirculation.* 1999;6:7-22.
406. Majno G, Palade GE. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;11:571-605.
407. Petzelbauer P, Bender JR, Wilson J, Pober JS. Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *J Immunol.* 1993;151:5062-5072.
408. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84:92-99.
409. Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Manepalli AN, Bajaj SP. Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. *Thromb Haemost.* 1999;82:1047-1052.
410. Osterud B, Bajaj MS, Bajaj SP. Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue factor expression under physiologic and pathologic conditions. On behalf of the Subcommittee on Tissue factor Pathway Inhibitor (TFPI) of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost.* 1995;73:873-875.
411. Ishii H, Salem HH, Bell CE, Laposata EA, Majerus PW. Thrombomodulin, an endothelial anticoagulant protein, is absent from the human brain. *Blood.* 1986;67:362-365.
412. LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007;232:1121-1129.
413. Hindmarsh EJ, Marks RM. Complement activation occurs on subendothelial extracellular matrix in vitro and is initiated by retraction or removal of overlying endothelial cells. *J Immunol.* 1998;160:6128-6136.
414. Sugahara K, Mikami T, Uyama T, Mizuguchi S, Nomura K, Kitagawa H. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13:612-620.
415. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng.* 2007;9:121-167.
416. Lipowsky HH. The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann Biomed Eng;*40:840-848.
417. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res;*87:300-310.
418. de Agostini AI, Watkins SC, Slayter HS, Youssoufian H, Rosenberg RD. Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta. *J Cell Biol.* 1990;111:1293-1304.

419. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91:3527-3561.
420. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:803-815.
421. Bongrazio M, Pries AR, Zakrzewicz A. The endothelium as physiological source of properdin: role of wall shear stress. *Mol Immunol*. 2003;39:669-675.
422. Dauchel H, Julien N, Lemerrier C, et al. Expression of complement alternative pathway proteins by endothelial cells. Differential regulation by interleukin 1 and glucocorticoids. *Eur J Immunol*. 1990;20:1669-1675.
423. Johnson E, Hetland G. Human umbilical vein endothelial cells synthesize functional C3, C5, C6, C8 and C9 in vitro. *Scand J Immunol*. 1991;33:667-671.
424. Ripoche J, Mitchell JA, Erdei A, et al. Interferon gamma induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *J Exp Med*. 1988;168:1917-1922.
425. Hamer R, Molostvov G, Lowe D, et al. Human leukocyte antigen-specific antibodies and gamma-interferon stimulate human microvascular and glomerular endothelial cells to produce complement factor C4. *Transplantation*. 2012;93:867-873.
426. Xu Y, Zacharias U, Peraldi MN, et al. Constitutive expression and modulation of the functional thrombin receptor in the human kidney. *Am J Pathol*. 1995;146:101-110.
427. Hollenberg MD. Proteinase-mediated signaling: proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci*. 2003;74:237-246.
428. Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*. 1991;78:3114-3124.
429. Blasi F, Vassalli JD, Dano K. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol*. 1987;104:801-804.
430. Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *Faseb J*. 1994;8:385-390.
431. Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest*. 1987;79:124-130.
432. Ritis K, Doumas M, Mastellos D, et al. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol*. 2006;177:4794-4802.
433. Broze GJ, Jr., Girard TJ. Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front Biosci*;17:262-280.
434. Eitzman DT, Westrick RJ, Bi X, et al. Lethal perinatal thrombosis in mice resulting from the interaction of tissue factor pathway inhibitor deficiency and factor V Leiden. *Circulation*. 2002;105:2139-2142.
435. Maroney SA, Cooley BC, Sood R, Weiler H, Mast AE. Combined tissue factor pathway inhibitor and thrombomodulin deficiency produces an augmented hypercoagulable state with tissue-specific fibrin deposition. *J Thromb Haemost*. 2008;6:111-117.
436. Kobayashi M, Wada H, Wakita Y, et al. Decreased plasma tissue factor pathway inhibitor levels in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost*. 1995;73:10-14.
437. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Faseb J*. 1995;9:883-889.
438. Seshan SV, Franzke CW, Redecha P, Monestier M, Mackman N, Girardi G. Role of tissue factor in a mouse model of thrombotic microangiopathy induced by antiphospholipid antibodies. *Blood*. 2009;114:1675-1683.
439. Thompson EA, Salem HH. Inhibition by human thrombomodulin of factor Xa-mediated cleavage of prothrombin. *J Clin Invest*. 1986;78:13-17.
440. Myles T, Nishimura T, Yun TH, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol Chem*. 2003;278:51059-51067.
441. Campbell WD, Lazoura E, Okada N, Okada H. Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol Immunol*. 2002;46:131-134.

442. Nishimura T, Myles T, Piliponsky AM, Kao PN, Berry GJ, Leung LL. Thrombin-activatable procarboxypeptidase B regulates activated complement C5a in vivo. *Blood*. 2007;109:1992-1997.
443. Chandler WL, Jelacic S, Boster DR, et al. Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2002;346:23-32.
444. Gordjani N, Sutor AH, Zimmerhackl LB, Brandis M. Hemolytic uremic syndromes in childhood. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23:281-293.
445. Bergstein JM, Riley M, Bang NU. Role of plasminogen-activator inhibitor type 1 in the pathogenesis and outcome of the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med*. 1992;327:755-759.
446. Raife T, Friedman KD, Fenwick B. Lepirudin prevents lethal effects of Shiga toxin in a canine model. *Thromb Haemost*. 2004;92:387-393.
447. Rondeau E, Mougenot B, Lacave R, Peraldi MN, Kruithof EK, Sraer JD. Plasminogen activator inhibitor 1 in renal fibrin deposits of human nephropathies. *Clin Nephrol*. 1990;33:55-60.
448. Xu Y, Hagege J, Mougenot B, Sraer JD, Ronne E, Rondeau E. Different expression of the plasminogen activation system in renal thrombotic microangiopathy and the normal human kidney. *Kidney Int*. 1996;50:2011-2019.
449. Michael M, Elliott EJ, Craig JC, Ridley G, Hodson EM. Interventions for hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Kidney Dis*. 2009;53:259-272.
450. Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. *Pharmacol Ther*. 2006;111:327-345.
451. Buehler PW, D'Agnillo F. Toxicological consequences of extracellular hemoglobin: biochemical and physiological perspectives. *Antioxid Redox Signal*. 2009;12:275-291.
452. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett*. 2005;157:175-188.
453. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, et al. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie*. 1998;80:173-195.
454. Garby L, Noyes WD. Studies on hemoglobin metabolism. I. The kinetic properties of the plasma hemoglobin pool in normal man. *J Clin Invest*. 1959;38:1479-1483.
455. Olsson MG, Allhorn M, Bulow L, et al. Pathological conditions involving extracellular hemoglobin: molecular mechanisms, clinical significance, and novel therapeutic opportunities for alpha(1)-microglobulin. *Antioxid Redox Signal*. 2011;17:813-846.
456. Raynes JG, Eagling S, McAdam KP. Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cells: differential regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. *Clin Exp Immunol*. 1991;83:488-491.
457. Kalmovarin N, Friedrichs WE, O'Brien HV, Linehan LA, Bowman BH, Yang F. Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation. *Inflammation*. 1991;15:369-379.
458. Kurosky A, Barnett DR, Lee TH, et al. Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77:3388-3392.
459. Hwang PK, Greer J. Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin . haptoglobin complex. *J Biol Chem*. 1980;255:3038-3041.
460. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001;409:198-201.
461. Buechler C, Ritter M, Orso E, Langmann T, Klucken J, Schmitz G. Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol*. 2000;67:97-103.
462. Vallelia F, Schaer CA, Kaempfer T, et al. Glucocorticoid treatment skews human monocyte differentiation into a hemoglobin-clearance phenotype with enhanced heme-iron recycling and antioxidant capacity. *Blood*. 2010;116:5347-5356.
463. Schaer DJ, Schaer CA, Buehler PW, et al. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood*. 2006;107:373-380.

464. Nielsen MJ, Petersen SV, Jacobsen C, et al. Haptoglobin-related protein is a high-affinity hemoglobin-binding plasma protein. *Blood*. 2006;108:2846-2849.
465. Tolosano E, Altruda F. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol*. 2002;21:297-306.
466. Morris CM, Candy JM, Edwardson JA, Bloxham CA, Smith A. Evidence for the localization of haemopexin immunoreactivity in neurones in the human brain. *Neurosci Lett*. 1993;149:141-144.
467. Tolosano E, Fagoonee S, Morello N, Vinchi F, Fiorito V. Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12:305-320.
468. Lillis AP, Mikhailenko I, Strickland DK. Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1884-1893.
469. Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*. 1992;269:375-382.
470. Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Hojrup P, Moller HJ, Moestrup SK. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood*. 2005;106:2572-2579.
471. Sharma S, Dimasi D, Broer S, Kumar R, Della NG. Heme carrier protein 1 (HCP1) expression and functional analysis in the retina and retinal pigment epithelium. *Exp Cell Res*. 2007;313:1251-1259.
472. Allhorn M, Berggard T, Nordberg J, Olsson ML, Akerstrom B. Processing of the lipocalin alpha(1)-microglobulin by hemoglobin induces heme-binding and heme-degradation properties. *Blood*. 2002;99:1894-1901.
473. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, et al. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9:2119-2137.
474. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem*. 2002;234-235:249-263.
475. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:323-354.
476. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *Faseb J*. 1988;2:2557-2568.
477. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-526.
478. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J*. 1989;3:2007-2018.
479. Jin ZG, Ueba H, Tanimoto T, Lungu AO, Frame MD, Berk BC. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2003;93:354-363.
480. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399:601-605.
481. Schechter AN, Gladwin MT. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med*. 2003;348:1483-1485.
482. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med*. 2002;8:1383-1389.
483. Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang KT, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8757-8761.
484. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, et al. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest*. 2005;115:3409-3417.
485. Deem S, Kim JU, Manjula BN, et al. Effects of S-nitrosation and cross-linking of hemoglobin on hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs. *Circ Res*. 2002;91:626-632.

486. Vogel WM, Dennis RC, Cassidy G, Apstein CS, Valeri CR. Coronary constrictor effect of stroma-free hemoglobin solutions. *Am J Physiol.* 1986;251:H413-420.
487. Doherty DH, Doyle MP, Curry SR, et al. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat Biotechnol.* 1998;16:672-676.
488. Nakai K, Sakuma I, Ohta T, et al. Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *J Lab Clin Med.* 1998;132:313-319.
489. Doyle MP, Apostol I, Kerwin BA. Glutaraldehyde modification of recombinant human hemoglobin alters its hemodynamic properties. *J Biol Chem.* 1999;274:2583-2591.
490. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood.* 2013;121:1276-1284.
491. Aft RL, Mueller GC. Hemin-mediated DNA strand scission. *J Biol Chem.* 1983;258:12069-12072.
492. Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood.* 2000;95:3442-3450.
493. Jeney V, Balla J, Yachie A, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood.* 2002;100:879-887.
494. Shono T, Ono M, Izumi H, et al. Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4231-4239.
495. Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:1921-1942.
496. Figueiredo RT, Fernandez PL, Mourao-Sa DS, et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2007;282:20221-20229.
497. Ogawa K, Sun J, Taketani S, et al. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *Embo J.* 2001;20:2835-2843.
498. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:9285-9289.
499. Chou AC, Fitch CD. Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. *J Clin Invest.* 1981;68:672-677.
500. Liu SC, Zhai S, Lawler J, Palek J. Hemin-mediated dissociation of erythrocyte membrane skeletal proteins. *J Biol Chem.* 1985;260:12234-12239.
501. Jarolim P, Lahav M, Liu SC, Palek J. Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of heme. *Blood.* 1990;76:2125-2131.
502. Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Am J Med.* 2003;115:721-728.
503. Singer ST, Kuypers FA, Styles L, Vichinsky EP, Foote D, Rosenfeld H. Pulmonary hypertension in thalassemia: association with platelet activation and hypercoagulable state. *Am J Hematol.* 2006;81:670-675.
504. Ziakas PD, Poulou LS, Rokas GI, Bartzoudis D, Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome. An overview. *J Thromb Haemost.* 2007;5:642-645.
505. Simionatto CS, Cabal R, Jones RL, Galbraith RA. Thrombophlebitis and disturbed hemostasis following administration of intravenous hematin in normal volunteers. *Am J Med.* 1988;85:538-540.
506. Watson CJ. Editorial: Hematin and porphyria. *N Engl J Med.* 1975;293:605-607.
507. Morris DL, Dudley MD, Pearson RD. Coagulopathy associated with hematin treatment for acute intermittent porphyria. *Ann Intern Med.* 1981;95:700-701.
508. Olsen SB, Tang DB, Jackson MR, Gomez ER, Ayala B, Alving BM. Enhancement of platelet deposition by cross-linked hemoglobin in a rat carotid endarterectomy model. *Circulation.* 1996;93:327-332.

509. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1987;92:639-646.
510. Studt JD, Kremer Hovinga JA, Antoine G, et al. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood.* 2005;105:542-544.
511. Becker CG, Wagner M, Kaplan AP, et al. Activation of factor XII-dependent pathways in human plasma by hematin and protoporphyrin. *J Clin Invest.* 1985;76:413-419.
512. Setty BN, Betal SG, Zhang J, Stuart MJ. Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia. *J Thromb Haemost.* 2008;6:2202-2209.
513. Catani MV, Bernassola F, Rossi A, Melino G. Inhibition of clotting factor XIII activity by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249:275-278.
514. Nangaku M, Alpers CE, Pippin J, et al. A new model of renal microvascular endothelial injury. *Kidney Int.* 1997;52:182-194.
515. Shao J, Miyata T, Yamada K, et al. Protective role of nitric oxide in a model of thrombotic microangiopathy in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:2088-2097.
516. Nakayama T, Sato W, Yoshimura A, et al. Endothelial von Willebrand factor release due to eNOS deficiency predisposes to thrombotic microangiopathy in mouse aging kidney. *Am J Pathol;*176:2198-2208.
517. Stief TW. Thrombin generation by hemolysis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2007;18:61-66.
518. Horne MK, 3rd, Cullinane AM, Merryman PK, Hoddeson EK. The effect of red blood cells on thrombin generation. *Br J Haematol.* 2006;133:403-408.
519. Schmitt TH, Frezzatti WA, Jr., Schreier S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch Biochem Biophys.* 1993;307:96-103.
520. Neely SM, Gardner DV, Green D, Ts'ao CH. Effect of hematin on endothelial cells and endothelial cell-platelet interactions. *Am J Pathol.* 1984;115:390-396.
521. Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG. Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997;216:456-463.
522. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood.* 2001;98:1802-1811.
523. Graca-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood.* 2002;99:4160-4165.
524. Tsuji A, Wang J, Stenzel KH, Novogrodsky A. Immune stimulatory and anti-tumour properties of haemin. *Clin Exp Immunol.* 1993;93:308-312.
525. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama.* 2005;293:1653-1662.
526. Gburek J, Verroust PJ, Willnow TE, et al. Megalin and cubilin are endocytic receptors involved in renal clearance of hemoglobin. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:423-430.
527. Yang Y, Ohta K, Shimizu M, et al. Selective protection of renal tubular epithelial cells by heme oxygenase (HO)-1 during stress-induced injury. *Kidney Int.* 2003;64:1302-1309.
528. Harrison HE, Bunting H, Ordway NK, Albrink WS. The Pathogenesis of the Renal Injury Produced in the Dog by Hemoglobin or Methemoglobin. *J Exp Med.* 1947;86:339-356.
529. Jaenike JR. The renal lesion associated with hemoglobinemia: a study of the pathogenesis of the excretory defect in the rat. *J Clin Invest.* 1967;46:378-387.
530. Zager RA. Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int.* 1996;49:314-326.
531. Rabiner SF, Helbert JR, Lopas H, Friedman LH. Evaluation of a stroma-free hemoglobin solution for use as a plasma expander. *J Exp Med.* 1967;126:1127-1142.

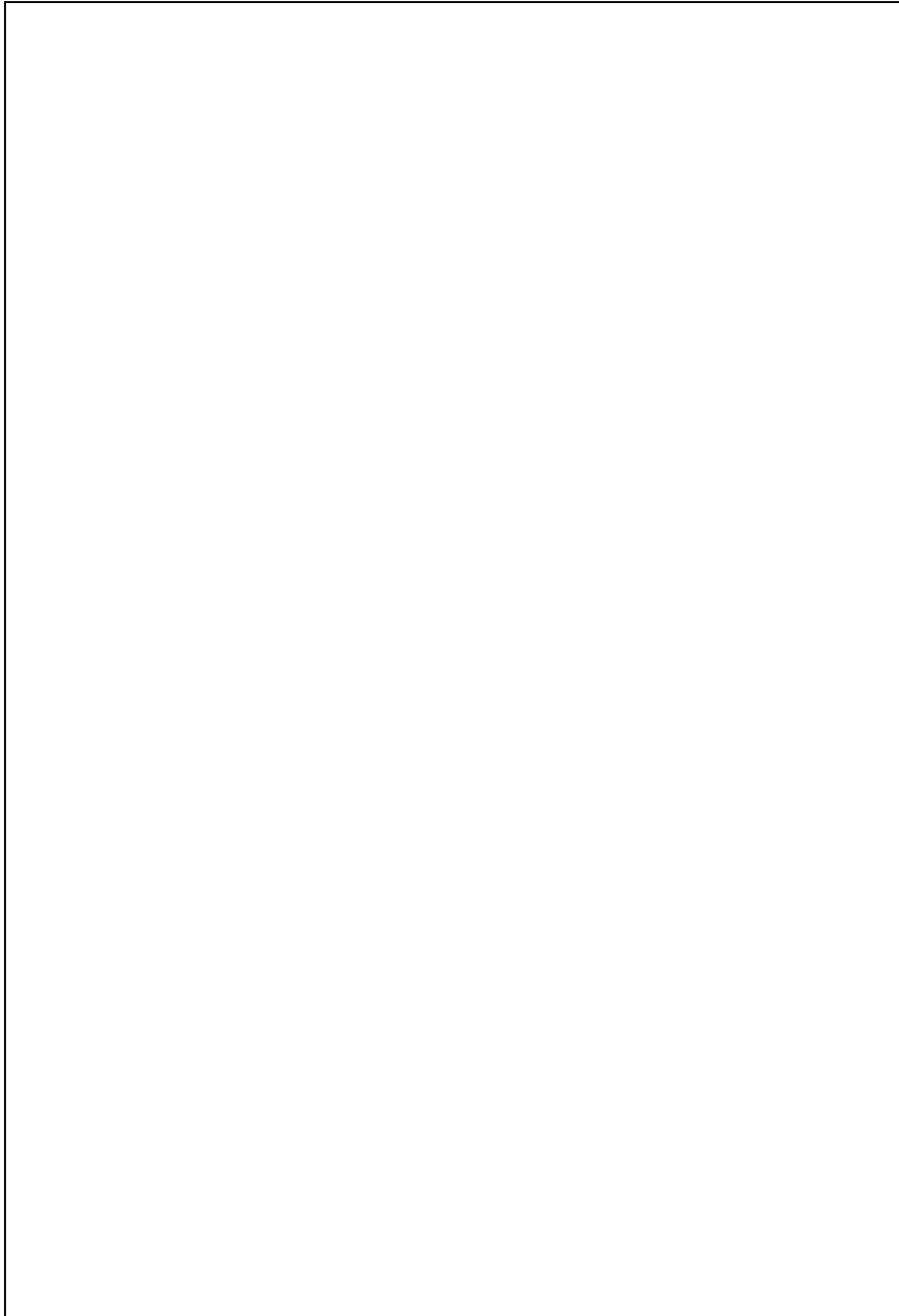
532. Tolosano E, Hirsch E, Patrucco E, et al. Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice. *Blood*. 1999;94:3906-3914.
533. Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol*. 2000;156:1527-1535.
534. Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int*. 2001;59:106-117.
535. Nath KA, Croatt AJ, Haggard JJ, Grande JP. Renal response to repetitive exposure to heme proteins: chronic injury induced by an acute insult. *Kidney Int*. 2000;57:2423-2433.
536. Stowell SR, Winkler AM, Maier CL, et al. Initiation and regulation of complement during hemolytic transfusion reactions. *Clin Dev Immunol*;2012:307093.
537. deCiutiis AC, Peterson CM, Polley MJ, Metakis LJ. Alternative pathway activation in sickle cell disease and beta-thalassemia major. *J Natl Med Assoc*. 1978;70:503-506.
538. Mold C, Tamerius JD, Phillips G, Jr. Complement activation during painful crisis in sickle cell anemia. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;76:314-320.
539. Wilson WA, Thomas EJ, Sissons JG. Complement activation in asymptomatic patients with sickle cell anaemia. *Clin Exp Immunol*. 1979;36:130-139.
540. Greenwood BM, Brueton MJ. Complement activation in children with acute malaria. *Clin Exp Immunol*. 1974;18:267-272.
541. Phanuphak P, Hanvanich M, Sakulramrung R, Moollaor P, Sitprija V, Phanthumkosol D. Complement changes in falciparum malaria infection. *Clin Exp Immunol*. 1985;59:571-576.
542. Wensch C, Spitzauer S, Florris-Linau K, et al. Complement activation in severe Plasmodium falciparum malaria. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;85:166-171.
543. Dasari P, Heber SD, Beisele M, et al. Digestive vacuole of Plasmodium falciparum released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation. *Blood*. 2012;119:4301-4310.
544. Adam C, Geniteau M, Gougerot-Pocidallo M, et al. Cryoglobulins, circulating immune complexes, and complement activation in cerebral malaria. *Infect Immun*. 1981;31:530-535.
545. Dasari P, Bhakdi S. Pathogenesis of malaria revisited. *Med Microbiol Immunol*. 2012;201:599-604.
546. Roth RI. Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin. *Blood*. 1994;83:2860-2865.
547. Kaca W, Roth R. Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and bacterial endotoxin. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1245:49-56.
548. Smith DJ, Winslow RM. Effects of extraerythrocytic hemoglobin and its components on mononuclear cell procoagulant activity. *J Lab Clin Med*. 1992;119:176-182.
549. Pawluczak AW, Lindorfer MA, Waitumbi JN, Taylor RP. Hematin promotes complement alternative pathway-mediated deposition of C3 activation fragments on human erythrocytes: potential implications for the pathogenesis of anemia in malaria. *J Immunol*. 2007;179:5543-5552.
550. Roumenina LT, Radanova M, Atanasov BP, et al. Heme interacts with c1q and inhibits the classical complement pathway. *J Biol Chem*. 2011;286:16459-16469.
551. Bitzan M, Bickford BB, Foster GH. Verotoxin (shiga toxin) sensitizes renal epithelial cells to increased heme toxicity: possible implications for the hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2334-2343.
552. Vinchi F, Tolosano E. Therapeutic approaches to limit hemolysis-driven endothelial dysfunction: scavenging free heme to preserve vasculature homeostasis. *Oxid Med Cell Longev*;2013:396527.
553. Vinchi F, De Franceschi L, Ghigo A, et al. Hemopexin therapy improves cardiovascular function by preventing heme-induced endothelial toxicity in mouse models of hemolytic diseases. *Circulation*. 2013;127:1317-1329.
554. Boretti FS, Buehler PW, D'Agnillo F, et al. Sequestration of extracellular hemoglobin within a haptoglobin complex decreases its hypertensive and oxidative effects in dogs and guinea pigs. *J Clin Invest*. 2009;119:2271-2280.

555. Lipiski M, Deuel JW, Baek JH, Engelsberger WR, Buehler PW, Schaer DJ. Human Hp1-1 and Hp2-2 Phenotype-Specific Haptoglobin Therapeutics Are Both Effective In Vitro and in Guinea Pigs to Attenuate Hemoglobin Toxicity. *Antioxid Redox Signal*. 2013.
556. Baek JH, D'Agnillo F, Vallelian F, et al. Hemoglobin-driven pathophysiology is an in vivo consequence of the red blood cell storage lesion that can be attenuated in guinea pigs by haptoglobin therapy. *J Clin Invest*. 2012;122:1444-1458.
557. Hashimoto K, Nomura K, Nakano M, Sasaki T, Kurosawa H. Pharmacological intervention for renal protection during cardiopulmonary bypass. *Heart Vessels*. 1993;8:203-210.
558. Kaul DK, Zhang X, Dasgupta T, Fabry ME. Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295:H39-47.
559. de Franceschi L, Baron A, Scarpa A, et al. Inhaled nitric oxide protects transgenic SAD mice from sickle cell disease-specific lung injury induced by hypoxia/reoxygenation. *Blood*. 2003;102:1087-1096.
560. Belcher JD, Vineyard JV, Bruzzone CM, et al. Heme oxygenase-1 gene delivery by Sleeping Beauty inhibits vascular stasis in a murine model of sickle cell disease. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88:665-675.
561. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52:2745-2756.
562. Satchell SC, Tasman CH, Singh A, et al. Conditionally immortalized human glomerular endothelial cells expressing fenestrations in response to VEGF. *Kidney Int*. 2006;69:1633-1640.
563. Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Buil A, et al. Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32. *Hum Mol Genet*. 2005;14:703-712.
564. Flyvbjerg A. Diabetic angiopathy, the complement system and the tumor necrosis factor superfamily. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6:94-101.
565. Noris M, Bucchioni S, Galbusera M, et al. Complement factor H mutation in familial thrombotic thrombocytopenic purpura with ADAMTS13 deficiency and renal involvement. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:1177-1183.
566. Bomback AS, Appel GB. Pathogenesis of the C3 glomerulopathies and reclassification of MPGN. *Nat Rev Nephrol*;8:634-642.
567. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol*. 2007;170:52-64.
568. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet*. 2003;361:206-210.
569. Trouw LA, Blom AM, Gasque P. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol*. 2008;45:1199-1207.
570. Neria F, Castilla MA, Sanchez RF, et al. Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int*. 2009;75:227-234.
571. Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1123:134-145.

Annexes

Annexe n°1 : *Protéines impliquées dans la cascade du complément (d'après Ricklin et al, Nature Immunology, 2010)*⁴

Annexe n°2 : *Classification des syndromes de microangiopathies thrombotiques proposée, en 2006, par l'European Paediatric Resaerch Group for HUS²¹⁴*



Nom : Frimat

Prénom : Marie

Date de soutenance : 30/10/2013

Titre de la thèse : Lésions endothéliales liées à un défaut de contrôle du complément : *de la génétique du complément au syndrome hémolytique et urémique*

Mots clés : syndrome hémolytique et urémique ; voie alterne du complément ; cellules endothéliales ; microangiopathie thrombotique ; hémolyse.

Résumé : L'identification fréquente de mutations des protéines régulatrices du complément suggère que les lésions endothéliales du syndrome hémolytique et urémique atypique (SHUa) résultent d'une activation incontrôlée de la voie alterne du complément. Les mutations, en soi, ne constituent cependant que des facteurs de susceptibilité et les mécanismes menant de l'anomalie de régulation du complément au développement de lésions de microangiopathie thrombotique rénale restent mal compris.

L'objectif de ce projet était donc d'étudier certains mécanismes de l'activation du complément à la surface des cellules endothéliales dans le SHUa et les conséquences de cette activation pour l'endothélium.

Dans ce but, ce travail s'est initialement concentré sur la mutation C3_{R139W}, dont nous avons réalisé la caractérisation phénotypique et fonctionnelle et qui a constitué un modèle d'étude des conséquences d'un complément mal régulé sur l'endothélium. Cette mutation a été identifiée de façon sporadique chez 4% des patients de la cohorte française de SHUa. Son étude phénotypique a mis en avant une évolution fonctionnelle rénale souvent sévère mais inhomogène ainsi qu'une fréquence non négligeable d'événements cardio-vasculaires. Sa caractérisation fonctionnelle a révélé une augmentation de son affinité pour le facteur B, à l'origine de la formation d'une « hyper C3 convertase », échappant également en partie aux systèmes de contrôle (diminution de liaison avec la MCP). L'étude de ses conséquences endothéliales a montré, à la surface de cellules pré-activées, une augmentation des produits d'activation du complément et de l'expression membranaire de facteur tissulaire, faisant le lien avec l'acquisition d'un phénotype endothélial prothrombotique. Nous rapportons également, sous l'effet de cette mutation, une majoration de la perméabilité et du détachement cellulaire, susceptibles de traduire une souffrance endothéliale.

Dans la deuxième partie et en vue de préciser les liens entre anomalie du complément et activation des cellules endothéliales, nous nous sommes intéressés au rôle de l'hème, dénominateur commun des SHU. Nous avons ainsi montré que l'hème libre activait la voie alterne du complément dans le sérum et à la surface des cellules endothéliales, et ce de façon exacerbée en cas de dysrégulation sous-jacente du complément. Nous avons identifié plusieurs mécanismes d'action par lesquels l'hème peut activer le complément : il favorise les interactions C3/C3 et ainsi la formation d'une hyper C3/C5 convertase, déclenche une mobilisation des corps de Weibel Palade à l'origine de l'expression membranaire de P-selectine, capable d'activer la voie alterne du complément et induit une diminution de l'expression membranaire des régulateurs, MCP et DAF.

Par ces travaux, nous avons précisé les liens entre activation du complément et acquisition d'un phénotype endothélial prothrombotique dans le SHUa. Nous avons notamment identifié l'hémolyse comme un acteur potentiel de l'amplification des lésions endothéliales complément-dépendantes, et dont le contrôle pourrait ainsi constituer une nouvelle voie thérapeutique dans le SHU.