

UNIVERSITE MOHAMMEDV –RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE –RABAT

ANNEE : 2017

THESE N° :41

**APPORT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE
DIAGNOSTIC DE L'HEMOGLOBINURIE
PAROXYSTIQUE NOCTURNE
THESE**

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mlle ELOUARDIGHI NAWAL

Née le 25 août 1992 à Salé

Pour l'Obtention du Doctorat en pharmacie

MOTS CLES : Hémoglobinurie Paroxystique nocturne ; CD55, CD59, Aplasie médullaire, cytométrie en flux.

MEMBRES DU JURY

Mr. A. MASRAR

Professeur d'Hématologie Biologie

Mme. S. BENKIRANE

Professeur d'Hématologie Biologie

Mme. M. NAZIH

Professeur d'Hématologie Biologie

Mr. A. DAMI

Professeur de Biochimie

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUJES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّا أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

سورة البقرة: الآية: 32

صَبَّحَهُ بِرَبِّكَ الْعَظِيمِ



**UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969: Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. Mohamed KARRA

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS
ET
PHARMACIENS**

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – <i>Clinique Royale</i>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSALD Younes	Pathologie Chirurgicale
--------------------	-------------------------

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. CHAHED OUZZANI Houria	Gastro-Entérologie
Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
Pr. YAHYAOUI Mohamed	Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. CHAD Bouziane
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne – Doyen de la FMPR
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUDI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation – Doyen de la FMPO
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – Dir. du Centre National PV
Chimie thérapeutique V.D à la pharmacie+Dir du CEDOC

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques Doyen de la FMMA



Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed

Gynécologie Obstétrique
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale- Directeur CHIS
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique

Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Traumatologie – Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI LallaOuafae
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie -Directeur HMI Med V
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie



Pr. ZBIR EL Mehdi*

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TAOUFIQ Jallal

Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN DakhamaBadr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MAHASSINI Najat

Cardiologie

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Pédiatrie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie

Gynécologie Obstétrique

Gastro-Entérologie
Neurologie – **Doyen de la FMP Abulcassis**
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie
Cardiologie



Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Traumatologie Orthopédie- **Dir. Hop. Av. Marr.**
Anesthésie-Réanimation **Inspecteur du SSM**
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie **Directeur Hop. ChekikhZaied**
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anatomie Pathologique

Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Pédiatrie
Neurologie

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

ORL

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSI Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie **Directeur. Hop.d'Enfants**
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie



Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique

Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
 Pr. CHOHO Abdelkrim *
 Pr. CHKIRATE Bouchra
 Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 Pr. EL HAOURI Mohamed *
 Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RACHID Khalid *
 Pr. RAISS Mohamed
 Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 Pr. RHOU Hakima
 Pr. SIAH Samir *
 Pr. THIMOU Amal
 Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 Pr. BOULAADAS Malik
 Pr. BOURAZZA Ahmed*
 Pr. CHAGAR Belkacem*
 Pr. CHERRADI Nadia
 Pr. EL FENNI Jamal*
 Pr. EL HANCHI ZAKI
 Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 Pr. HACHI Hafid
 Pr. JABOUIRIK Fatima
 Pr. KHARMAZ Mohamed
 Pr. MOUGHIL Said
 Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
 Pr. TARIB Abdelilah*
 Pr. TIJAMI Fouad
 Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
 Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 Pr. ALLALI Fadoua
 Pr. AMAZOUZI Abdellah
 Pr. AZIZ Noureddine*
 Pr. BAHIRI Rachid

Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Rhumatologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie



Pr. BARKAT Amina
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZAOUI Sakina*
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Saïd*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine

Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid

Pédiatrie
Cardiologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie (mise en disponibilité)
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Anesthésie Réanimation

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique

Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Réanimation médicale

Pr. ACHACHI Leila
 Pr. ACHOUR Abdessamad*
 Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
 Pr. AMHAJJI Larbi*
 Pr. AOUI Sarra
 Pr. BAITE Abdelouahed*
 Pr. BALOUCH Lhousaine*
 Pr. BENZIANE Hamid*
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHARKAOUI Naoual*
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
 Pr. ELABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GHARIB Noureddine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhoussain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ezzohra*
 Pr. RABHI Monsef*
 Pr. RADOUANE Bouchaib*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine*
 Pr. SIFAT Hassan*
 Pr. TABERKANET Mustafa*
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour*
 Pr. TLIGUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Pneumo phtisiologie
 Chirurgie générale
 Chirurgie cardio vasculaire
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Anesthésie réanimation *Directeur*
 Biochimie-chimie
 Pharmacie clinique
 Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologique
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie

Ophtalmologie



Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
Pr. AGDR Aomar*
Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
Pr. AKHADDAR Ali*
Pr. ALLALI Nazik
Pr. AMINE Bouchra
Pr. ARKHA Yassir
Pr. BELYAMANI Lahcen*
Pr. BJIJOU Younes
Pr. BOUHSAIN Sanae*
Pr. BOUI Mohammed*
Pr. BOUNAIM Ahmed*
Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
Pr. CHAKOUR Mohammed *
Pr. CHTATA Hassan Toufik*
Pr. DOGHMI Kamal*
Pr. EL MALKI Hadj Omar
Pr. EL OUENNASS Mostapha*
Pr. ENNIBI Khalid*
Pr. FATHI Khalid
Pr. HASSIKOU Hasna *
Pr. KABBAJ Nawal
Pr. KABIRI Meryem
Pr. KARBOUBI Lamya
Pr. L'KASSIMIHachemi*
Pr. LAMSAOURI Jamal*
Pr. MARMADE Lahcen
Pr. MESKINI Toufik
Pr. MESSAOUDI Nezha *
Pr. MSSROURI Rahal
Pr. NASSAR Ittimade
Pr. OUKERRAJ Latifa
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. CHADLI Mariama*
Pr. CHEMSI Mohamed*
Pr. DAMI Abdellah*

Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale

Médecine interne
Pédiatre
Chirurgie Générale
Neurologie
Neuro-chirurgie
Radiologie
Rhumatologie
Neuro-chirurgie
Anesthésie Réanimation
Anatomie
Biochimie-chimie
Dermatologie
Chirurgie Générale
Traumatologie orthopédique
Hématologie biologique
Chirurgie vasculaire périphérique
Hématologie clinique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Médecine interne
Gynécologie obstétrique
Rhumatologie
Gastro-entérologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Microbiologie ***Directeur Hôpital My Ismail***
Chimie Thérapeutique
Chirurgie Cardio-vasculaire
Pédiatrie
Hématologie biologique
Chirurgie Générale
Radiologie
Cardiologie
Pneumo-phtisiologie



Anesthésie réanimation
Médecine interne
Physiologie
ORL
Microbiologie
Médecine aéronautique
Biochimie chimie

Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. LAMALMI Najat
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. BELAIZI Mohamed*
Pr. BENCHEBBA Driss*
Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. RAISSOUNI Maha*

Février 2013

Pr. AHID Samir
Pr. AIT EL CADI Mina
Pr. AMRANI HANCHI Laila
Pr. AMOUR Mourad
Pr. AWAB Almahdi
Pr. BELAYACHI Jihane
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr. BENCHEKROUN Laila
Pr. BENKIRANE Souad
Pr. BENNANA Ahmed*
Pr. BENSGHIR Mustapha*
Pr. BENYAHIA Mohammed*
Pr. BOUATIA Mustapha
Pr. BOUABID Ahmed Salim*
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
Pr. CHAIB Ali*
Pr. DENDANE Tarek
Pr. DINI Nouzha*
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
Pr. ELFATEMI Nizare

Radiologie
Chirurgie pédiatrique
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie plastique et réparatrice
Urologie
Gastro entérologie
Anatomie pathologique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie générale
Hématologie
Anatomie pathologique

Chirurgie Pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Psychiatrie
Traumatologie Orthopédique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie pathologique
Psychiatrie
Cardiologie



Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique0.
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie

Pr. EL GUERROUJ Hasnae
 Pr. EL HARTI Jaouad
 Pr. EL JOUDI Rachid*
 Pr. EL KABABRI Maria
 Pr. EL KHANNOUSSI Basma
 Pr. EL KHLOUFI Samir
 Pr. EL KORAICHI Alae
 Pr. EN-NOUALI Hassane*
 Pr. ERRGUIG Laila
 Pr. FIKRI Meryim
 Pr. GHFIR Imade
 Pr. IMANE Zineb
 Pr. IRAQI Hind
 Pr. KABBAJ Hakima
 Pr. KADIRI Mohamed*
 Pr. LATIB Rachida
 Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr. MEDDAH Bouchra
 Pr. MELHAOUI Adyl
 Pr. MRABTI Hind
 Pr. NEJJARI Rachid
 Pr. OUBEJJA Houda
 Pr. OUKABLI Mohamed*
 Pr. RAHALI Younes
 Pr. RATBI Ilham
 Pr. RAHMANI Mounia
 Pr. REDA Karim*
 Pr. REGRAGUI Wafa
 Pr. RKAIN Hanan
 Pr. ROSTOM Samira
 Pr. ROUAS Lamiaa
 Pr. ROUIBAA Fedoua*
 Pr. SALIHOUN Mouna
 Pr. SAYAH Rochde
 Pr. SEDDIK Hassan*
 Pr. ZERHOUNI Hicham
 Pr. ZINE Ali*

Médecine Nucléaire
 Chimie Thérapeutique
 Toxicologie
 Pédiatrie
 Anatomie Pathologie
 Anatomie
 Anesthésie Réanimation
 Radiologie
 Physiologie
 Radiologie
 Médecine Nucléaire
 Pédiatrie
 Endocrinologie et maladies métaboliques
 Microbiologie
 Psychiatrie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie



Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*
 Pr. GHOUNDALE Omar*
 Pr. ZYANI Mohammad*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Urologie
 Médecine Interne

**Enseignants Militaires*

MARS 2014

ACHIR ABDELLAH
BENCHAKROUN MOHAMMED
BOUCHIKH MOHAMMED
EL KABBAJ DRISS
EL MACHTANI IDRISSE SAMIRA
HARDIZI HOUYAM
HASSANI AMALE
HERRAK LAILA
JANANE ABDELLA TIF
JEAIDI ANASS
KOUACH JAOUAD
LEMNOUER ABDELHAY
MAKRAM SANAA
OULAHYANE RACHID
RHISSASSI MOHAMED JMFAR
SABRY MOHAMED
SEKKACH YOUSSEF
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Urologie
Hématologie Biologique
Génécologie-Obstétrique
Microbiologie
Pharmacologie
Chirurgie Pédiatrique
CCV
Cardiologie
Médecine Interne
Génécologie-Obstétrique



***Enseignants Militaires**

DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'
AIT BOUGHIMA FADILA
BEKKALI HICHAM
BENAZZOU SALMA
BOUABDELLAH MOUNYA
BOUCHRIK MOURAD
DERRAJI SOUFIANE
DOBLALI TAOUFIK
EL AYOUBI EL IDRISSE ALI
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM
EL MARJANY MOHAMMED
FEJJAL NAWFAL
JAHIDI MOHAMED
LAKHAL ZOUHAIR
OUDGHIRI NEZHA
Rami Mohamed
SABIR MARIA
SBAI IDRISSE KARIM

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

***Enseignants Militaires**

AOÛT 2015

Meziane meryem
Tahri latifa

Dermatologie
Rhumatologie

JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE
EL ASRI FOUAD
ERRAMI NOUREDDINE
NITASSI SOPHIA

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L



2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootéchnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbas	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

*Mise à jour le 14/12/2016 par le
Service des Ressources Humaines*




Dédicaces



À ceux qui ont toujours cru en moi
À ceux qui m'ont toujours encouragé
Je dédie cette thèse à





*À ALLAH Le tout
miséricordieux, Le tout
puissant*

*Qui m'a inspiré, Qui m'a guider sur
le droit chemin,*

*Je vous dois ce que je suis devenue,
Soumission, louanges et
remerciements, Pour votre clémence
et miséricorde.*



*À mes très chers parents,
ELAARABCHI FATIMA,
EL OUARDIGHI ABDELMAJID,*

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti

Pour moi durant mes longues années d'études.

Je n'aurais jamais espéré avoir de meilleurs parents.

*Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant
Et de m'avoir appris de vivre dans l'honneur et dans la dignité.*

Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement

Mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude.

Veillez trouver dans ce travail le fruit de toutes

Vos peines et vos sacrifices

Que Dieu vous garde et vous procure santé,

longue vie et

Bonheur éternel





À Mes très chers frères : Imane; et Soufiane

Vous êtes ma joie, ma force, mon énergie positive...

*Pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que vous portez
à ma vie, pour votre soutien, votre compréhension
et vos encouragements.*

*Je souhaite que vous trouviez dans ce travail,
le témoignage de l'attachement, de l'amour et des sentiments
les plus sincères et les plus affectueux que je porte pour vous.*

Que dieu vous protège et vous réserve un bon avenir





À mon très cher mari ABDELLFATTAH Bouchaib

Et ma chère copine BENDAH Imane

Aucun mot ne pourrait exprimer l'attachement, l'amour

et la tendresse que j'éprouve pour vous.

vous êtes le plus précieux cadeau dans ma vie

que Dieu vous garde.

Que cette thèse vous traduit ma profonde affection





À toute ma famille

*Je vous dédie ce travail en témoignage
de mes sentiments les plus sincères.*

*Puisse Dieu vous garder en bonne santé et vous prêter une
longue vie pleine de bonheur, santé et de prospérité.*

Que dieu vous protège





À Mes chères amies : Ouafaa, Hanane, Tahira, Sarah

Je vous dédie ce travail en témoignage

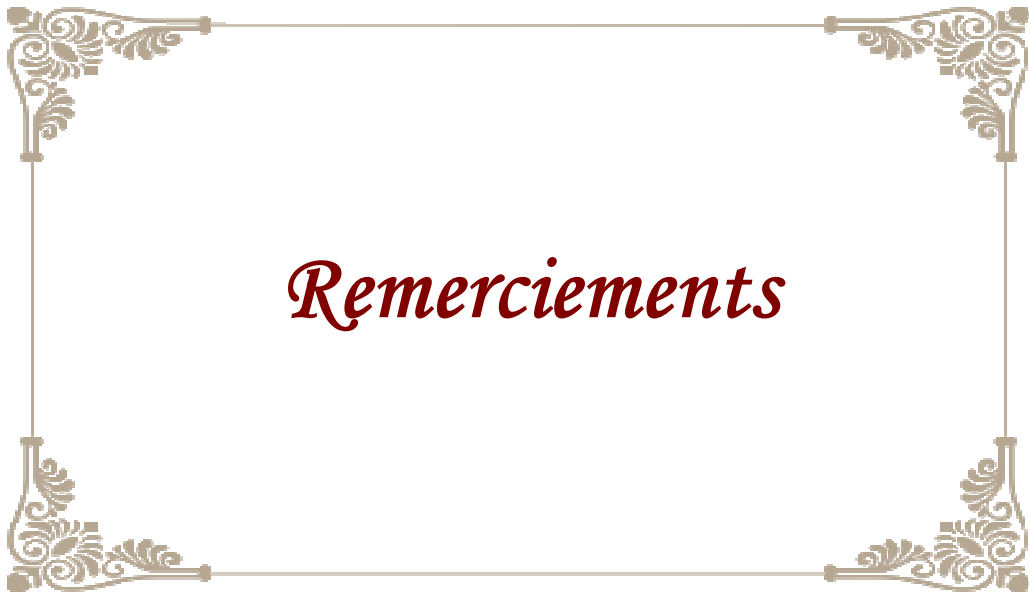
de ma grande affection

et amour et pour tous les beaux moments qu'on a partagé.

Je vous souhaite une florissante santé, un prospère avenir

et une vie couronnée de succès





Remerciements



À Notre Maître et Président de thèse

À Mr AZLARAB MASRAR

Professeur d'Hématologie Biologique à la Faculté

De Médecine et de Pharmacie de Rabat

*Vous avez bien voulu nous faire honneur
en acceptant de présider les Jury de cette thèse.*

*Vos qualités humaines et professionnelles sont
pour nous un exemple à suivre.*

Soyez assuré de notre vive reconnaissance

et de notre profond respect.





*À notre Maître et rapporteur de thèse,
Madame SOUAD BENKIRANE
Professeur d'Hématologie Biologique à la Faculté
de Médecine et de Pharmacie de Rabat.*

*Merci de m'avoir fait l'honneur de diriger
ce travail et d'apporter votre contribution à ce jury.*

*Je tiens à vous remercier pour l'enseignement dispensé
au cours de ces années et pour vos conseils avisés.*

*Vous m'avez guidé en me conseillant et en consacrant
une partie de votre temps précieux, malgré les responsabilités
et les charges de vos fonctions.*





À notre Maître et Membre du Jury,

À Mr Abdellah DAMI

*Professeur de Biochimie à la Faculté
de Médecine et de Pharmacie de Rabat*

*C'est pour moi un immense plaisir et une grande
fierté de vous compter parmi les membres du jury.*

*Votre dynamisme et votre grande compétence
ont toujours forcé mon admiration.*

Je vous remercie de la spontanéité et la gentillesse

avec lesquelles vous avez bien voulu accepter

de juger ce travail. Je vous en serais toujours reconnaissant.





À Notre Maître et Juge de thèse

À Madame Mouna NAZIH

*Professeur d'Hématologie Biologique à la Faculté
de Médecine et de Pharmacie de Rabat*

*Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous
nous faites en acceptant de juger ce travail.*

*Nous portons une grande considération tant pour
votre extrême gentillesse que pour vos qualités professionnelles.*

*Veillez trouver ici, cher Maître, l'expression de notre
profond respect et de notre sincère reconnaissance.*





Au Docteur Afafe Hamama

Je vous remercie de la gentillesse

avec laquelle vous avez bien accepter

de nous aider dans ce travail et pour vos précieux conseils qui m'ont

beaucoup éclairé afin de mener à bien ce travail.

Je vous en serais toujours reconnaissante.



LISTE DES ABREVIATIONS

APC :Alternative Pathway of Complement

ADAMTS13 :adisintegrin and metalloproteasewiththrombospondintype I repeats-13

AVK : anti vitamine K

CMF : La cytométrie en flux

CSH :cellule souchehématopoïétique

DAF :decay accelerating factor

FLAER :fluorescently labelledaerolysin

GLcNAc : glucosamine N-acétyl

GMPc : Guanosinemonophosphate cyclique

GPI :glycosyl-phophatidyl-inositol

GR :globules rouges

HBPM : héparine à bas poids moléculaire

HPN : Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne

HR : hazard ratio

IC : intervalle de confiance

LDH : lactate déshydrogénase

MAC :complexed'attaquemembranaire

MIRL :membrane inhibitor of reactive lysis

NK :cellules natural killer

NO :oxydenitrique

PIG A :glycosylphosphatidylinositol glycan class A

PNN : Polynucléaires neutrophiles

SAL : Le sérum antilymphocytaire

SMD : syndrome myélodysplasique

U-PA : L'activateur du plasminogène du type urokinase



***LISTE DES
ILLUSTRATIONS***

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les symptômes cliniques de diagnostic [52].

Tableau II : exemples de protéines à ancrage GPI [30].

Tableau III: Recommandations pour la cytométrie en flux dans le diagnostic et la gestion de l'HPN [52].

Tableau IV: suivi des patients présentant un clone HPN [3,90].

Tableau V: Etude comparative et randomisée du traitement immunosuppresseur dans le traitement d'aplasies médullaires graves [60].

Tableau VI : schéma thérapeutique des patients traités par éculizumab[119].

Tableau VII : Recommandations pour les urgences hospitalières [122].

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : biosynthèse des protéines à ancrage GPI dans le réticulum endoplasmique [20].

Figure 2 : structure de l'ancrage glycosylphosphatidylinositol [20]

Figure 3 : localisation de la mutation de gène PIGA sur le chromosome X [24].

Figure 4 : Cascade d'activation du complément et rôle du CD55 et du CD59 [26].

Figure 5 : Échelle de couleurs des urines chez les patients ayant une HPN [15].

Figure 6: Principales hypothèses expliquant la survenue de thromboses en cas d'HPN [26].

Figure 7 : Test de Ham-Dacie [73].

Figure 8 : expression du CD59 sur les GR chez un patient HPN, illustration des hématies de type I, II Et III [3].

Figure 9 : représentation des 3 composants d'un cytomètre : le fluidique, l'optique et l'électronique [86].

Figure 10: L'analyse par cytométrie en flux de globules rouges dans HPN en utilisant une combinaison d'anti-CD59 FITC, anti-CD55 PE et anti-CD235a CyChrome [52].

Figure 11: L'analyse par cytométrie en flux de granulocytes dans HPN en utilisant une combinaison de FITC anti-CD15, anti-CD24 PE et anti-CD16 PE: Cy5 [52].

Figure 12: L'analyse par cytométrie en flux de haute précision des érythrocytes [52].

Figure 13 : diagramme représentant les GR du patient [89].

Figure 14 : analyse par cytométrie en flux des GR du patient [89].

Figure 15 : analyse par cytométrie en flux des PNN du patient [89].

Figure 16 : diagramme représentant les GR du patient [89].

Figure 17 : analyse par cytométrie en flux des GR du patient [89].

Figure 18 : analyse par cytométrie en flux des PNN du patient [89].

Figure19 : Prophylaxie de thrombose veineuse par la warfarine [114].

Figure 20 : mécanisme d'action de l'éculizumab [115].

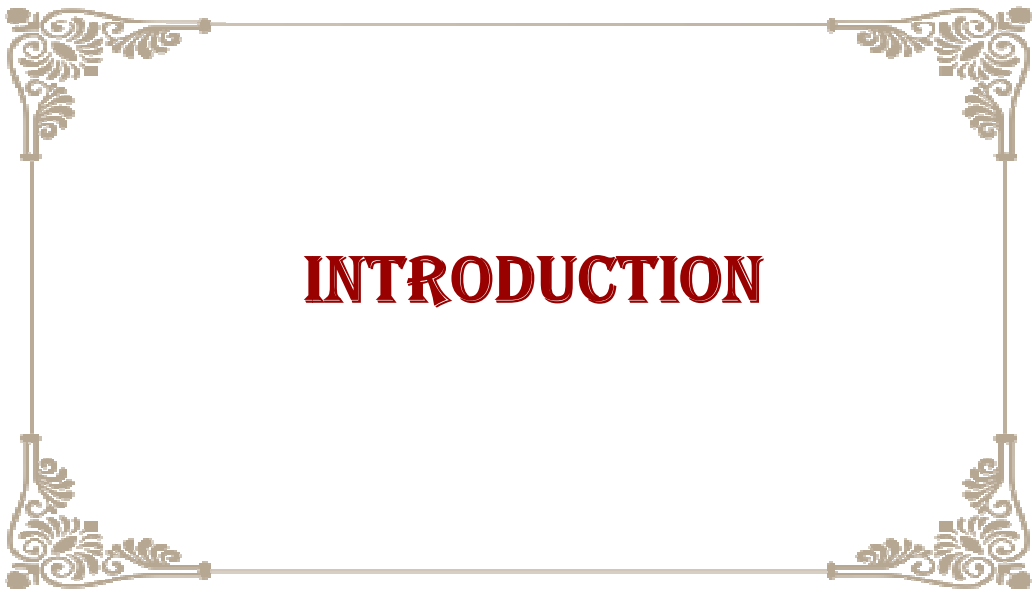


SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
RAPPEL SUR L'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE	4
HISTORIQUE :	5
EPIDEMIOLOGIE :	5
PHYSIOPATHOLOGIE :	6
3.1 Ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI)	6
3.2 Mutation de gène PIG-A	8
3.3 L'insuffisance médullaire	9
3.4 Rôle du complément	9
3.5 Rôle du déficit en oxyde nitrique.....	11
3.6 Hémoglobinurie paroxystique nocturne, maladie clonale non maligne .	11
4. Manifestations cliniques.....	12
4.1 Hémolyse intravasculaire chronique.....	13
4.2 Dystonie des muscles lisses et l'oxyde nitrique	14
4.3 Atteinte rénale	15
4.4 Thrombose	15
4.5 Aplasie médullaire	17
5. Classification.....	18
6. Facteurs pronostics et histoire naturelle de la maladie.....	19
DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE.....	20
1. Quand rechercher un clone HPN ?.....	21
2. Les tests historiques	22
2.1 Test d'hémolyse en sérum acidifié = Test de Ham-Dacie.....	22
2.2 Test d'hémolyse à faible force ionique = test au sucre.....	23

3. Autres examens biologiques	24
4. Cytometrie en flux : vers une meilleure détection du clone	25
4.1 La cytométrie en flux : test diagnostique de référence.....	25
4.2 Principes de la cytométrie en flux	28
4.3 Recommandations pour la cytométrie en flux dans le diagnostic et la gestion de l'HPN.....	31
4.4 Stratégie d'analyse	32
4.5 Cytométrie en flux de haute précision.....	35
4.6 Présentation des résultats	37
4.7 Exemples de patients HPN diagnostiqués au Laboratoire Central d'Hématologie de l'Hôpital Ibn Sina:.....	38
4.8 Suivi des patients présentant un clone HPN	41
4.9 Le FLAER.....	41
5. Autres approches diagnostiques.....	42
TRAITEMENT ET RECOMMANDATIONS POUR LES URGENCES...	44
1. Traitement	45
1.1 Les traitements classiques.....	46
1.1.1 La greffe de moelle osseuse allogénique.....	46
1.1.2 Les immunosuppresseurs.....	47
1.1.3 Les androgènes	49
1.1.4 Transfusion Sanguine	50
1.1.5 Anticoagulants	50
1.1.6 Antiagrégants Plaquettaires	51
1.2 Eculizumab ou Soliris®.....	51
2- Recommandations pour les urgences	55

2.1 HPN et Grossesse.....	55
2.2 Situations d'urgence	56
2.3 Mesures préventives à prendre	57
CONCLUSION.....	59
RESUMES.....	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	65



INTRODUCTION

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ou maladie de marchiafava-micheli est une maladie rare et clonale de cellules souches hématopoïétiques affectant toutes les lignées de cellules sanguines, avec une incidence estimée de 1,3 cas par million d'habitants par an. La maladie est causée par une mutation somatique acquise dans le gène PIGA (phosphatidylinositolglycan de classe A) codant pour une enzyme essentielle à la biosynthèse d'ancre glycoposphatidylinositol (GPI). L'absence de production de cette enzyme fonctionnelle entraîne une absence totale ou partielle de protéines fixées par GPI sur les surfaces cellulaires [1-4].

Le facteur d'accélération de la désintégration des protéines liées au glycoposphatidylinositol (DAF; CD55) et l'inhibiteur membranaire de la lyse réactive (MIRL; CD59) sont responsables de la plupart des manifestations cliniques associées à l'HPN [5,6].

Cette maladie polymorphe se traduit par des symptômes inconstants, notamment des accidents thrombo-emboliques graves, une insuffisance médullaire, une hémolyse et des signes fonctionnels altérant la qualité de vie des patients [7-8].

Son diagnostic est difficile car le mode de présentation est varié, et les tests classiques d'hémolyse (test de Ham-Dacie et test de sucrose) sont souvent négatifs [9]. Les progrès de la cytométrie en flux ont permis à cet outil de devenir la méthode de référence pour le diagnostic de l'HPN.

Le traitement dépend de la symptomatologie est donc diffère pour chaque patient. Le seul traitement curatif est la greffe de moelle osseuse allogénique mais il est responsable d'une forte mortalité, et par conséquent il n'est proposé que dans les formes aplasiques. Une nouvelle thérapie ciblée a été récemment

développée dans les formes hémolytiques : l'éculizumab, révolutionnant le pronostic et la prise en charge de cette maladie [10-11].

Ce travail va projeter la lumière sur les dernières actualités et les données récentes concernant l'hémoglobinurie paroxystique nocturne au niveau de sa physiopathologie, ses méthodes de diagnostic biologique, son traitement actuel ainsi que les recommandations pour les urgences hospitalières.



**RAPPEL SUR L'HÉMOGLOBINURIE
PAROXYSTIQUE NOCTURNE**

HISTORIQUE :

A la fin du XIX^e siècle, William Gull fut l'un des premiers à décrire cette pathologie chez un patient de 29 ans présentant une asthénie, des douleurs abdominales et une hémoglobinurie paroxystique nocturne sévère, exacerbées par l'alcool et l'exercice physique. Puis Paul Strübing publia une description clinique d'un patient présentant une hémoglobinurie intermittente accompagnée d'une hémolyse intravasculaire [12].

Marchiafava et Nazani en 1911 puis Micheli en 1931 établirent le tableau clinique complet de cette pathologie.

Au début du XX^e siècle, Van der Berg démontra que les hématies des patients malades lysent en présence de sérum acidifié, suspectant ainsi l'action du complément.

En 1937, Ham développa son test diagnostique in vitro.

Dans les années 1960, des études biochimiques décrivent un déficit en Decay Accelerating Factor DAF ou CD55 chez les patients HPN. En 1963, Dacie émet l'hypothèse d'un clone acquis par mutation somatique d'une cellule souche.

Dans les années 1990, la cytométrie en flux se développa considérablement et permit de mettre en évidence l'absence de certaines protéines à la surface de cellules hématopoïétiques.

En 1993, Kinoshita et ses collègues prouvèrent qu'il s'agissait d'une mutation du gène PIG-A en montrant que la transfection de l'ADN complémentaire de PIG-A restaurait le déficit GPI de lignées lymphoblastoïdes issues de patients HPN [13,14].

En 1996, Luzzatto et Rotoli montrèrent que le clone HPN possédait un avantage de croissance intrinsèque.

Puis 2007, Approbation par la FDA et la commission européenne de l'éculizumab[15].

EPIDEMIOLOGIE :

L'HPN est une maladie rare qui touche environ 8.000 à 10.000 personnes en Amérique du Nord et en Europe [16]. Elle frappe souvent les gens dans la fleur de l'âge, avec un âge moyen d'apparition dans le début des années 30.

La prévalence minimale estimée entre 1 et 1,5 cas par million [17]. Elle a une épidémiologie générale, tout comme l'anémie aplasique, les deux sont plus fréquentes chez les adultes jeunes avec une augmentation plus tard dans la septième décennie. L'HPN se

développe sans avertissement et peut survenir chez les hommes et les femmes de toutes les races, origines et âges. L'HPN est souvent méconnue, avec des retards dans le diagnostic souvent allant d'une année à plus d'une décennie.

La survenue d'une thrombose est nettement inférieure chez les populations des pays d'Asie orientale (5-10% vs 30-40% dans les populations européennes et la descendance européenne) [16]. La médiane de survie estimée pour les patients atteints d'HPN est de 10 à 15 ans [16].

PHYSIOPATHOLOGIE :

3.1 Ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI)

Les protéines exprimées physiologiquement à la membrane des cellules sanguines sont normalement synthétisées dans l'HPN, elles ne sont pas présentes sur les cellules de patients atteints d'HPN en raison du défaut de synthèse de leur système d'ancrage GPI. Cette ancre confère à la protéine non seulement des propriétés mécaniques d'attache mais aussi des caractéristiques biochimiques (clivage par des phospholipases spécifiques) et des propriétés physiologiques particulières (grande mobilité latérale) [18].

GPI est synthétisé dans le réticulum endoplasmique et est transféré *en bloc* à l'extrémité carboxy terminale d'une protéine qui a un peptide signal d'attachement GPI. Le GPI-AP mature est ensuite transporté vers la membrane plasmique et se trouve dans des microdomaines de 50 à 350 nm connus sous le nom de radeaux lipidiques. La biosynthèse de l'ancre GPI implique au moins 10 réactions et plus de 20 gènes différents [19] (figure1).

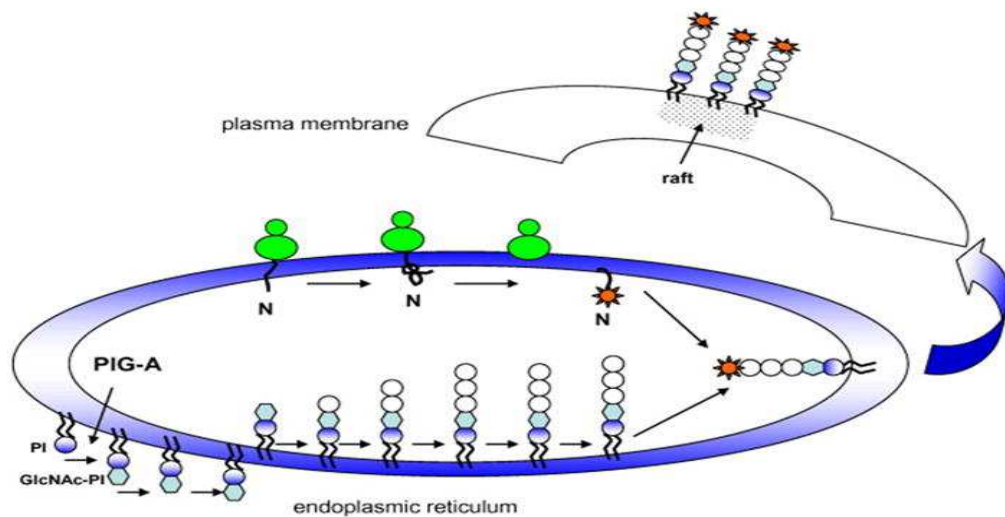


Figure 1 : biosynthèse des protéines à ancrage GPI dans le réticulum endoplasmique [20]

La structure de noyau commun de GPI consiste en une molécule de phosphatidylinositol, et un noyau de glycane qui contient la glucosamine, trois mannoses et un phosphate d'éthanolamine (figure 2). Étant donné les nombreux produits génétiques impliqués dans l'assemblage de l'ancre GPI, il semblait improbable que l'HPN soit la conséquence d'une seule mutation génétique. Cependant, après une recherche intense de cette voie, il est apparu que chez tous les patients atteints de HPN, le défaut pouvait être attribué à des mutations dans le gène *PIGA* [21,22]. Plus tard, il a été déterminé que le gène *PIGA* réside sur le chromosome X et que son produit fait partie d'un complexe qui transfère la N-acétylglucosamine au phosphatidylinositol pour former la GlcNAc-PI, première étape de la biosynthèse de l'ancre GPI [23]. Ainsi, un seul «coup» génèrera un phénotype HPN puisque les mâles n'ont qu'un chromosome X et chez les femelles un chromosome X est inactivé par lyonisation. Il est concevable qu'une mutation dans l'un des gènes de cette voie causerait la maladie; Cependant d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse d'ancre GPI sont situés sur des autosomes. Des mutations inactivantes dans ces gènes devraient se produire sur les deux allèles pour produire le phénotype HPN.

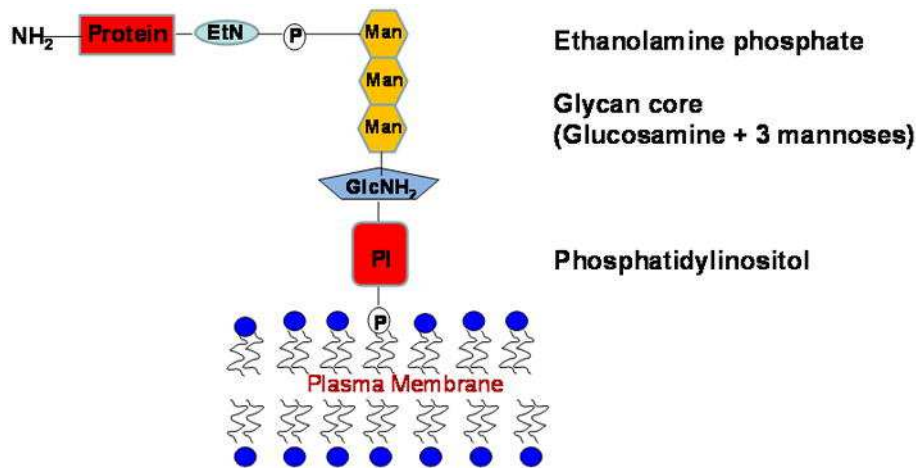


Figure 2 : structure de l’ancre glycosylphosphatidylinositol [20]

3.2 Mutation de gène *PIG-A*

L’hémoglobinurie paroxystique nocturne est causée par une mutation somatique acquise du gène *PIG-A* (PhosphatidylinositolGlycane de classe A, porté par le chromosome X, Xp22.1 (figure3)) dans une ou plusieurs cellules souches hématopoïétiques [2]. Ce gène est responsable de la production d’une enzyme intervenant dans la synthèse du glycosylphosphatidylinositol (GPI).

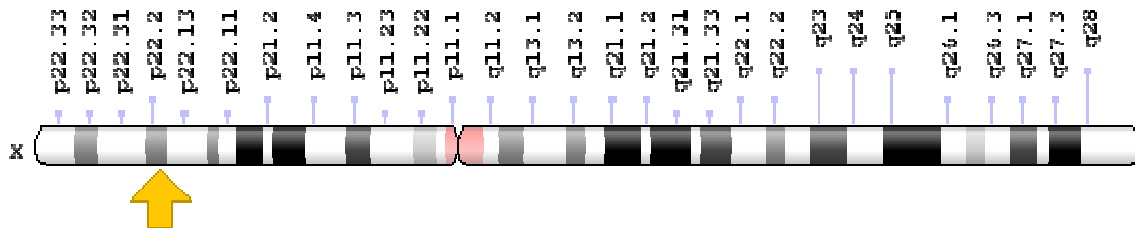


Figure 3 : localisation de la mutation de gène *PIGA* sur le chromosome X [24].

Le gène *PIG-A* comporte 6 exons, il se situe sur le bras court du chromosome X, mesure 17 Kb et sa protéine pèse 60kDa [25]. Point important, les mutations décelées à ce jour se situent sur l’ensemble du gène, et il est illusoire de croire au développement d’un diagnostic moléculaire en pratique clinique, pour l’HPN [26].

Les mutations sont réparties sur la région codante entière sans regroupement évident. La plupart des mutations entraînent un décalage du cadre de lecture et ainsi conduisent à une protéine sans activité enzymatique, ce qui explique le déficit complet en molécules GPI-ancrées (cellules de type III). Les cellules HPN de type II [1] découlent de mutations ponctuelles dans le gène codant ainsi pour une protéine avec une fonction résiduelle, ce qui explique leur faible niveau d'expression.

Très récemment ont été décrites des altérations moléculaires d'autres gènes PIG : PIG-M, responsable d'une encéphalopathie néonatale mais ne s'accompagnant pas d'une anémie hémolytique et PIG-T, décrit chez un patient allemand atteint d'HPN. À la différence de PIG-A, l'HPN liée à des mutations dans le gène PIG-T (qui est un autosome) implique l'existence d'une mutation germinale sur un des allèles et l'acquisition d'une mutation somatique des cellules souches hématopoïétiques [27].

3.3 L'insuffisance médullaire

Une des composantes centrales de la physiopathologie de l'HPN est l'insuffisance de la moelle osseuse. Elle accompagne l'apparition de cellules sanguines déficientes en molécules à ancrage GPI. L'insuffisance médullaire est présente chez tous les patients atteints d'HPN, même quand la numération formule sanguine est normale. Le degré d'insuffisance médullaire varie d'un patient à l'autre, certains présentent un tableau d'aplasie médullaire sévère et d'autres peuvent ne présenter qu'un nombre réduit de cellules souches comme le seul signe d'insuffisance médullaire [28,29].

3.4 Rôle du complément

L'hémolyse intravasculaire chronique qui est la manifestation clinique phare de l'HPN est médiée par la voie alterne du complément (APC: Alternative Pathway of Complement) [30].

L'APC est une composante de l'immunité innée [31]. Ce système ancien a évolué pour protéger l'hôte contre l'invasion par les microorganismes pathogènes. Contrairement à la voie classique du complément qui fait partie du système de l'immunité acquise et nécessite un

anticorps pour l'initiation de l'activation, l'APC est dans un état d'activation continue, armé à tout moment pour protéger l'hôte. La cascade APC peut être divisée en 2 composantes fonctionnelles: l'amplification C3 et C5 convertases et le complexe d'attaque de la membrane cytolitique (MAC). Les convertases C3 et C5 sont des complexes enzymatiques qui initient et amplifient l'activité de l'APC et engendrent finalement le complexe d'attaque membranaire (MAC) (le MAC est la sous-unité cytolitique commune des voies classique et lectine du complément ainsi que l'APC (Figure 4).

Les érythrocytes humains normaux sont protégés contre la cytolysé médiée par l'APC principalement par DAF (CD55) [32,6]. Et MRL (CD59) [33,34]. Ces protéines agissent à différentes étapes dans la cascade du complément. CD55 régule la formation et la stabilité des convertases C3 et C5, alors que CD59 bloque la formation du MAC (figure 4). La carence de CD55 et de CD59 sur les érythrocytes de l'HPN est la base physiopathologique de test direct d'antiglobuline négatif, hémolyse intravasculaire qui est la caractéristique clinique de la maladie.

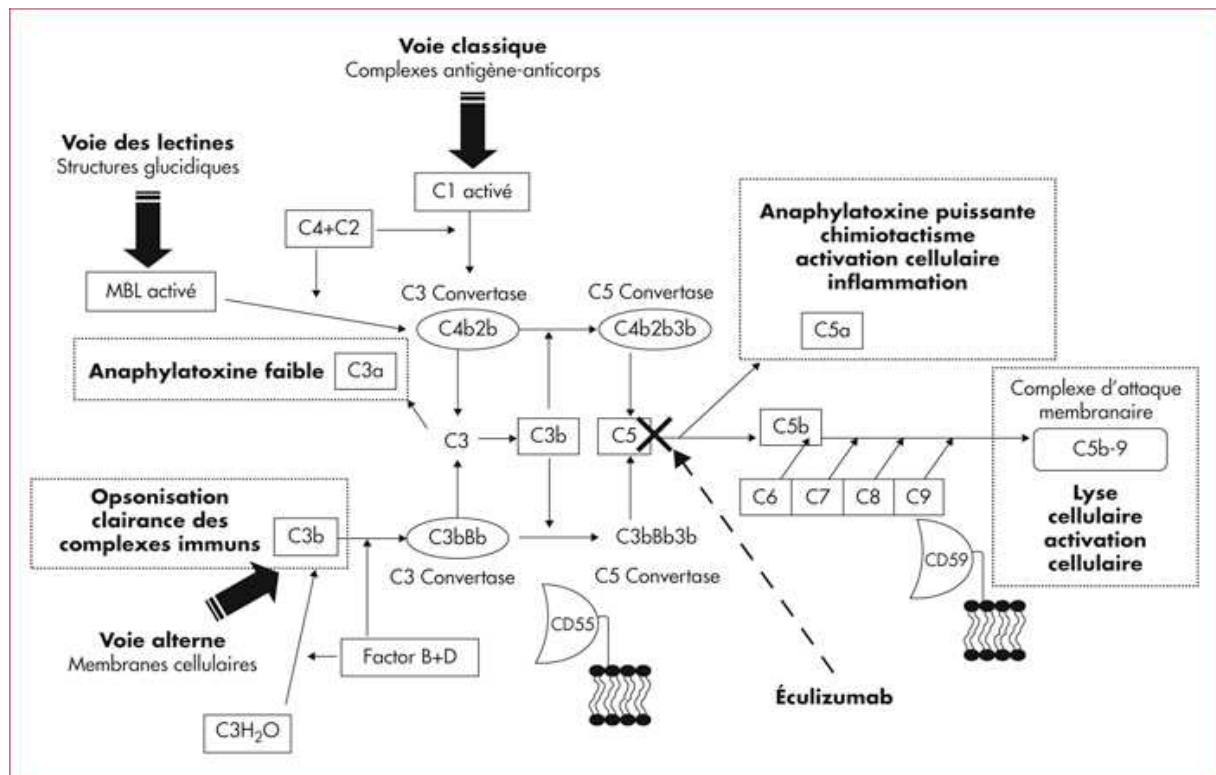


Figure 4 : Cascade d'activation du complément et rôle du CD55 et du CD59 [26].

3.5 Rôle du déficit en oxyde nitrique

Ce déficit en NO qui est une conséquence de l'hémolyse est responsable de la plupart des signes cliniques. Il entraîne, d'une part, une contraction des muscles lisses et des dystonies, responsables des douleurs abdominales, de la dysphagie, de la dysfonction érectile et, d'autre part, une activation et une agrégation plaquettaire à l'origine des thromboses [35].

3.6 Hémoglobinurie paroxystique nocturne, maladie clonale non maligne

L'HPN est caractérisée par la coexistence, chez la majorité des patients, de cellules normales et de cellules mutées (le « clone » HPN). L'importance relative du clone HPN et de l'hématopoïèse normale est variable d'un patient à l'autre et peut évoluer au cours du temps. Ces éléments sont en faveur du modèle proposé par Rotoli et Luzzatto, selon lequel la population médullaire GPI négative (issue d'une ou de plusieurs cellules souches) possède un avantage de croissance (ou de survie) face à un mécanisme d'agression responsable d'une aplasie médullaire [25,36]. Des travaux anciens avaient montré l'hétérogénéité des précurseurs myéloïdes vis-à-vis de l'action lytique du complément et que cette hétérogénéité était bien liée à la coexistence de populations GPI-positive (normale) et négative (mutée). La population des cellules souches médullaires (CD34+) exprime les molécules GPI suivantes : CD55, CD59 et Thy-1 (Cdw90). Chez un nombre limité de patients présentant une HPN, il a été démontré qu'il existe dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique des populations CD34+/CD59+ et CD34+/CD59-. Par ailleurs, il a été montré que la mutation de *PIG-A* était nécessaire mais non suffisante pour entraîner une HPN, puisqu'elle est présente chez certains sujets sains [37–39]. Même dans les modèles murins d'inactivation (knock out) conditionnelle du gène où la maladie hémolytique peut être reproduite, il n'existe aucun avantage de prolifération des cellules *PIG-A* mutées [40–43].

L'avènement des techniques de séquençage à haut débit a récemment complexifié la problématique de la maladie clonale dans l'HPN. En effet, dans l'HPN (comme dans l'aplasie médullaire) ont été récemment décrites [44,45] des mutations somatiques dans des gènes impliqués dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) et les leucémies aiguës (BCOR,

TET2, ASXL1, DMT3A, pour ne citer que les plus fréquents). Ces mêmes gènes ont été aussi trouvés fréquemment mutés chez des patients présentant des cytopénies d'origine indéterminée, avec ou sans signes de dysmyélopoïèse [46]. Enfin, on retrouve ces mutations chez des sujets indemnes de toute maladie hématologique et leur fréquence augmente avec l'âge [47,48]. Certains ont donc été tentés d'assimiler l'HPN avec les SMD. Selon les auteurs, il n'existe aucun argument scientifique pour corroborer cette hypothèse. L'HPN est une maladie non maligne, dont l'évolution vers un SMD ou une leucémie demeure exceptionnelle, et il n'existe pas d'argument scientifique démontrant que ces mutations sont à l'origine de l'avantage de prolifération des cellules HPN.

4. MANIFESTATIONS CLINIQUES

Le tableau clinique est polymorphe [49- 51].

Tableau I: Les symptômes cliniques de diagnostic [52].

Symptômes	Fréquence (pour-cent)
Anémie	35
Hémoglobinurie	26
Hémorragies	18
anémie aplasique	13
Symptômes gastro-intestinaux	10
Anémie hémolytique et jaunisse	9
anémie par carence en fer	6
maladie thromboembolique	6
Infections	5
symptômes neurologiques	4

4.1 Hémolyse intravasculaire chronique

L'hémolyse est la conséquence de l'absence de molécules GPI, en particulier du CD55 et du CD59, qui se traduit par une sensibilité anormale des érythrocytes au complément in vitro. Le mécanisme des crises hémolytiques est cependant moins bien connu. Il semble qu'à l'occasion d'une infection ou d'un stress, les globules rouges des patients réexpriment à leur surface des antigènes cryptiques (du système Th). Les antigènes Th sont alors reconnus par le système immunitaire, celui-ci active le complément qui n'est plus régulé par CD55 et CD59, aboutissant en une crise hémolytique [53].

L'hémolyse intravasculaire chronique se manifeste cliniquement par anémie hémolytique acquise d'origine corpusculaire, apparaissant chez un adulte jeune, accompagnée d'urines foncées le matin (hémoglobinurie) (fig.5) et parfois d'un ictère modéré [11]. L'anémie est accompagnée de signes de régénération modérée (réticulocytose) et souvent d'une leucopénie et/ou d'une thrombopénie généralement non sévères [54].

Morphologiquement, les globules rouges semblent normaux, bien que certains cas présentent une poïkilocytose légère à modérée et une anisocytose. Les taux d'haptoglobine sont généralement faibles, et Le taux de lactate déshydrogénase (LDH) est fréquemment élevé.

De multiples facteurs influencent le degré d'hémolyse dans l'HPN, y compris la taille et le type du clone de la HPN et le degré d'activation du complément. En général, le pourcentage d'érythrocytes HPN est en corrélation avec le degré d'hémolyse.

En pratique courante, l'HPN est diagnostiquée dans deux circonstances: celle d'une maladie hémolytique et thrombosante dite forme classique que l'on peut appeler l'HPN «primitive» ou «de novo» ou celle de la découverte d'un clone HPN chez un patient atteint d'aplasie médullaire traitée quelques mois, ou années, auparavant par immunosuppression. Cette présentation est plus volontiers appelée syndrome aplasie-HPN ou forme aplasique. Enfin, plus rarement, le diagnostic d'HPN a été associé à un certain nombre d'hémopathies malignes myéloïdes.



Figure 5 : Échelle de couleurs des urines chez les patients ayant une HPN [15].

4.2 Dystonie des muscles lisses et l'oxyde nitrique

L'hémolyse est responsable d'une libération massive d'hémoglobine libre dans le plasma, saturant rapidement les mécanismes d'élimination de l'hémoglobine. L'hémoglobine se lie et consomme rapidement l'haptoglobine, la rendant indétectable au dosage. L'hémoglobine en excès lie de façon irréversible l'oxyde nitrique (NO). D'autre part, l'hémolyse libère dans le plasma de l'arginase érythrocytaire diminuant ainsi la l-arginine, substrat nécessaire à la production de NO. La consommation et la diminution de production sont responsables d'un déficit en NO. Le déficit en NO entraîne une diminution de la concentration intracellulaire du Guanosinemonophosphate cyclique(GMPc) qui a un rôle dans l'élimination du calcium intracellulaire au niveau des muscles lisses. La surcharge calcique intracellulaire des muscles lisses serait alors responsable d'une dystonie musculaire se manifestant par une dysphagie, des douleurs abdominales et une dysfonction érectile. Le déficit en NO est à l'origine d'une vasoconstriction pouvant favoriser les complications thrombotiques [55].

4.3 Atteinte rénale

Les patients atteints d'HPN peuvent présenter des manifestations rénales semblables à celles observées avec l'anémie falciforme. La fonction tubulaire perturbée et la diminution de la clairance de la créatinine se retrouvent chez un pourcentage élevé de patients. Radiologiquement, les patients peuvent présenter de gros reins, infarctus corticaux, amincissement cortical et nécrose papillaire. Les patients atteints de HPN présentent un dépôt marqué d'hémosidérine dans les tubules proximaux; Cependant, la thrombose microvasculaire peut être responsable de bon nombre des anomalies rénales dans l'HPN [56]. L'insuffisance rénale aiguë après une hémolyse massive se produit rarement et se résout habituellement en quelques jours ou semaines.

4.4 Thrombose

La physiopathologie des thromboses dans l'HPN est pour l'instant mal connue mais plusieurs hypothèses [57], non mutuellement exclusives, ont été proposées (Figure 6). L'accumulation de l'hémoglobine libre pourrait jouer un rôle en activant les cellules endothéliales et les plaquettes, et possiblement en inhibant l'ADAMTS13 (adisintegrin and metalloproteasewiththrombospondintype I repeats-13), enzyme responsable de la clairance des grands multimères du facteur vonWillebrand. Le déficit en NO entraînerait une activation des cellules endothéliales, une vasoconstriction, une inflammation et la génération de thrombine. Le déficit en protéines GPI-dépendantes (surtout le CD59) à la membrane cellulaire des plaquettes, des monocytes et des cellules endothéliales serait responsable d'une activation directe par le complément, entraînant l'exposition membranaire du facteur tissulaire et donc la génération de thrombine. Le complément induit aussi la formation à partir des plaquettes de microvésicules circulantes, riches en phospholipides, très procoagulantes in vitro (leur concentration est forte dans le plasma des patients avec HPN).

Enfin, une diminution de l'expression du récepteur de l'urokinase type plasminogenactivator(uPA), molécule GPI-dépendante, a été observée chez les patients atteints d'HPN, à la surface des monocytes, des plaquettes et des cellules endothéliales [58].

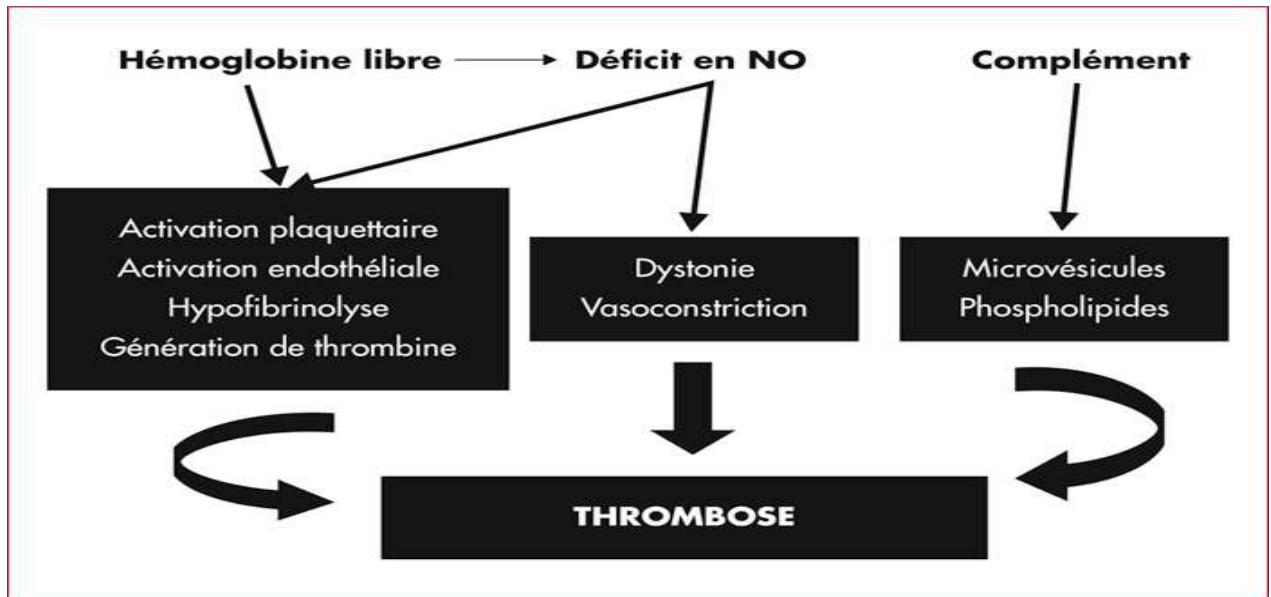


Figure 6: Principales hypothèses expliquant la survenue de thromboses en cas d'HPN [26].

La thrombose est la première cause de mortalité de la maladie et sa survenue représente le facteur pronostic le plus défavorable. Vingt-neuf à 44 % des patients atteints d'HPN feront un épisode thrombotique au cours de l'évolution de leur maladie [57], et celui-ci est inaugural chez un malade sur 10 [26]. Bien que le risque semble corrélé avec la taille du clone, l'incidence des thromboses reste élevée chez les sujets ayant des clones HNP représentant moins de 10 % des polynucléaires neutrophiles [57]. Ces complications surviennent dans des sites inhabituels et ont tendance à récidiver au même endroit. Par ordre de fréquence, les veines sus-hépatiques, intracérébrales et intra-abdominales sont les plus touchées. Les autres sites inhabituels décrits sont l'épiderme, le derme, le rein, l'épididyme et le corps caverneux. Dans leurs localisations sus-hépatiques, les thromboses sont à l'origine d'un syndrome de Budd-Chiari, souvent récidivant et évoluant vers la cirrhose. Les thromboses des veines et sinus intracérébraux peuvent donner des tableaux insidieux (céphalées traînantes), ou très aigus (syndrome méningé). Les thromboses intra-abdominales (veine porte, veines spléniques et veine cave inférieure) se compliquent souvent d'hypersplénisme, plus rarement de rupture de la rate, d'ulcérations muqueuses et de douleurs abdominales [57, 49, 26]. Quant aux

thromboses artérielles, elles sont observées chez 1-10 % des patients, à des sites habituels, notamment dans les artères coronaires et cérébrales [59].

4.5 Aplasie médullaire

Le terme « aplasie » désigne un défaut ou une quasi-absence de production de la moelle osseuse en globules rouges (transport de l'oxygène), en globules blancs (défenses immunitaires) et plaquettes (coagulation). L'aplasie médullaire est une insuffisance médullaire quantitative par arrêt de production des cellules souches hématopoïétiques (CSH) responsable d'une défaillance globale de l'hématopoïèse et d'une pancytopénie d'origine centrale (le taux de réticulocytes < 120 Giga/l) avec atteinte des 3 lignées myéloïdes (lignées érythrocytaires, granulocytaires et plaquettaires) [60].

L'anémie aplasique provoque donc trois catégories de symptômes. D'abord, ceux qui sont communs aux différents types d'anémie : soit les signes d'une carence en globules rouges et donc d'un transport déficient de l'oxygène.

Ensuite, les symptômes associés au manque de globules blancs (vulnérabilité aux infections), et enfin, au manque de plaquettes sanguines (troubles de coagulation). On peut ainsi ajouter un autre problème qui affecte environ 50 à 60% de tous les patients atteints d'anémie aplasique qui est l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) [61].

Dans la publication récente du registre international des patients ayant un clone HNP, 48 % d'entre eux présentaient une forme d'insuffisance médullaire : aplasie, anémie hypoplasique ou myélodysplasie [62]. Il semblerait que, même en l'absence de cytopénies, les cultures de cellules médullaires montrent une diminution de la croissance des progéniteurs [63]. Deux tiers des patients présenteront une neutropénie et/ou une thrombopénie au cours de l'évolution de leur maladie [49]. Il existe également une association fréquente entre l'HNP et l'aplasie de moelle et l'on met très souvent en évidence de petits clones HNP chez des patients ayant une aplasie – plus de 50 % des patients – surtout après traitement par immunosuppresseurs [64]. Moins souvent, de petits clones HNP sont retrouvés dans les syndromes myélodysplasiques, notamment dans l'anémie réfractaire. Enfin, sur 100 patients ayant une HPN et suivis sur 10 ans, 3,8 % développeront un syndrome myélodysplasique et/ou une leucémie aiguë [49].

L'aplasie médullaire est considérée actuellement comme une maladie auto-immune. L'hypothèse est que l'antigène impliqué dans le développement de l'aplasie médullaire est un antigène GPI ancré ; les cellules du clone HPN n'ayant pas cet antigène ancré auraient ainsi un avantage de survie les mettant à l'abri de l'agression auto-immune et favorisant leur expansion [65].

5. CLASSIFICATION

L'international PNH Interest Group a proposé une classification qui tient compte du tableau clinique et des variations biologiques [66].

HPN Classique : Les patients présentent les manifestations cliniques de l'hémolyse intra vasculaire, mais aucun autre symptôme correspondant à une anomalie pathologique médullaire. La moelle est riche avec une hyperplasie érythroïde et une morphologie normale à sub-normale, sans aucune anomalie caryotypique récurrente.

HPN associée à une autre pathologie médullaire : Les patients présentent les manifestations cliniques de l'hémolyse intravasculaire, mais aussi de façon concomitante, ou dans leur historique, une pathologie liée à un désordre médullaire. L'analyse de la moelle osseuse et la cytogénétique sont utilisées pour déterminer si l'HPN est associée à un syndrome myélodysplasique, une anémie arégénérative, ou tout autre myélopathie. Une anomalie génétique spécifique d'une pathologie médullaire peut permettre d'orienter le diagnostic.

HPN Subclinique : Les patients ne présentent aucun symptôme clinique ou biologique d'hémolyse. Dans certains cas, une petite proportion inférieure à 0,5 % de cellules HPN peuvent être détectées en utilisant une cryométrie de haute précision, principalement dans les anémies arégénératives et les syndromes myélodysplasiques. Dans ces cas précis, l'existence de ce petit clone serait un marqueur de l'origine auto-immune de la maladie et de sa bonne réponse aux traitements [67].

6. FACTEURS PRONOSTICS ET HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE

La durée médiane de survie avant l'avènement de l'éculizumab était de 22 ans [49, 51]. Outre les douleurs abdominales et les complications infectieuses (infections récurrentes de la sphère oto-rhino-laryngologique, pulmonaires en particulier), l'histoire naturelle de l'HPN peut être marquée par des complications beaucoup plus sévères : les épisodes de thromboses représentaient la première cause de décès, avant les complications infectieuses et la survenue d'hémopathies myéloïdes.

Les facteurs influençant la survie des patients sont l'âge (plus de 40 ans au diagnostic), l'anémie et la neutropénie au diagnostic, le délai avant mise en route d'un traitement (reflet de l'absence de gravité de certains cas), et la survenue de complications : aplasie médullaire, hémopathies malignes et, surtout, les complications thrombotiques.

La forme classique était grevée d'un moins bon pronostic (médiane de survie de 18 ans alors que cette dernière n'était pas atteinte pour la forme aplasique). Les patients atteints d'HPN de forme classique sont plus âgés (40 versus 30 ans) et ont plus fréquemment des douleurs abdominales. La taille du clone est plus élevée (clone HPN > 50 % chez la moitié des patients). Durant l'évolution, environ 20 % des patients ayant une forme classique développent une aplasie médullaire, témoignant de l'étroite relation entre HPN et aplasie médullaire. Si les thromboses sont une complication connue de la forme classique, il ressort de l'étude française un risque élevé dans la forme aplasique (30 % à dix ans).

Concernant la forme aplasique, on retrouve un rôle protecteur du traitement immunosuppresseur, illustrant le bénéfice de ce traitement dans la prise en charge des aplasies médullaires au sens large.

Ces éléments de pronostic doivent désormais être réévalués à l'ère de l'éculizumab. Dans une étude française, les données de 123 patients traités par éculizumab depuis 2005 ont été analysées et leur devenir a été comparé à celui de 191 patients similaires de la cohorte historique [68]. Le taux de survie à six ans des patients atteints d'une forme hémolytique est de 92 % (intervalle de confiance [IC] à 95 % : 87–98) dans la cohorte récente contre 80 % (IC 95 % : 70–91) dans la cohorte historique (hazard ratio [HR] : 0,38 ; IC 95 % : 0,15–0,94 ; $p = 0,037$). Cela est avant tout lié à une incidence moindre de thromboses (4 versus 27 %).



DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

1. Quand rechercher un clone HPN ?

➤ Au diagnostic

Le tableau clinique de l'HPN est polymorphe, il est constitué d'assez nombreux symptômes peu spécifiques. En raison de la rareté de la maladie, son dépistage ne doit pas être réalisé d'emblée devant des symptômes peu évocateurs, mais devant [52] :

- Une hémoglobinurie (à l'origine du diagnostic dans 26%des cas) ;
- Une hémolyse intravasculaire à test de coombs négatif ;
- Une thrombose veineuse à un site inhabituel (surtout si associé à une hémolyse intravasculaire) ou récurrente (avec bilan de thrombophilie négatif) ;
 - ✓ Syndrome de Budd-Chiari (veines sus-hépatiques) ;
 - ✓ Veines mésentériques et portale,
 - ✓ Veines cérébrales,
 - ✓ Veines dermiques ;
- Une thrombose difficile à traiter, voire récidivante par une anticoagulation efficace ;
- Une association d'une thrombose veineuse et artérielle ;
- Une aplasie médullaire ;
- Une myélodysplasie (anémie réfractaire) ;
- Une dysphagie ou des douleurs abdominales épisodiques, accompagnées d'une hémolyse intravasculaire.

A noter qu'il est intéressant de rechercher périodiquement un clone HPN (de façon annuelle ou en cas d'événement comme une thrombose...) chez les patients ayant une aplasie médullaire ou une myélodysplasie. En effet le clone peut-être présent au diagnostic ou apparaître plus tard. Il est important de le rechercher car c'est un facteur de bonne réponse au traitement immunosuppresseur et ces patients doivent être plus surveillés en raison du risque de thrombose.

De même, les patients qui ont présenté une thrombose et/ou une hémolyse et dont le diagnostic de l'HPN classique est fortement suspecté doivent être testés plusieurs fois en cas d'échec du test initial.

➤ **Pendant le suivi**

Il paraît raisonnable de surveiller le clone à intervalles réguliers. Si le malade est stable, un suivi annuel est suffisant mais il doit être plus fréquent en cas de modifications dans les paramètres biologiques et/ou cliniques.

Les patients AM/HPN doivent être aussi suivis car ils peuvent évoluer aussi vers une HPN hémolytique. Ce qui peut se prédire avec une augmentation de la taille du clone.

2. Les tests historiques

Ce sont des méthodes biochimiques dont le principe repose sur la sensibilité accrue des hématies du clone au complément [69-71].

2.1 Test d'hémolyse en sérum acidifié = Test de Ham-Dacie

Le test de Ham a pour objet de mettre en évidence une sensibilité excessive de la membrane érythrocytaire à l'action lytique du complément en milieu acide, permet de mesurer l'hémolyse survenant lors de l'incubation des hématies (fig.7) du patient à 37°C pendant 45 min en présence de plusieurs échantillons de sérum frais acidifié (apport du complément provenant d'un individu normal ABO compatible [72]) à pH (6,5 à 7). Après centrifugation, l'hémolyse est appréciée à l'œil nu ou au spectromètre par la couleur du surnageant. Les réactions témoins utilisant les mêmes échantillons sériques, mais décomplémentés par le chauffage à 56°C pendant 30 min, et doivent être négatives. Le degré d'hémolyse dépend du taux des globules rouges anormal dans l'échantillon. Il varie donc d'un malade à l'autre et dans le temps chez le même malade [72].

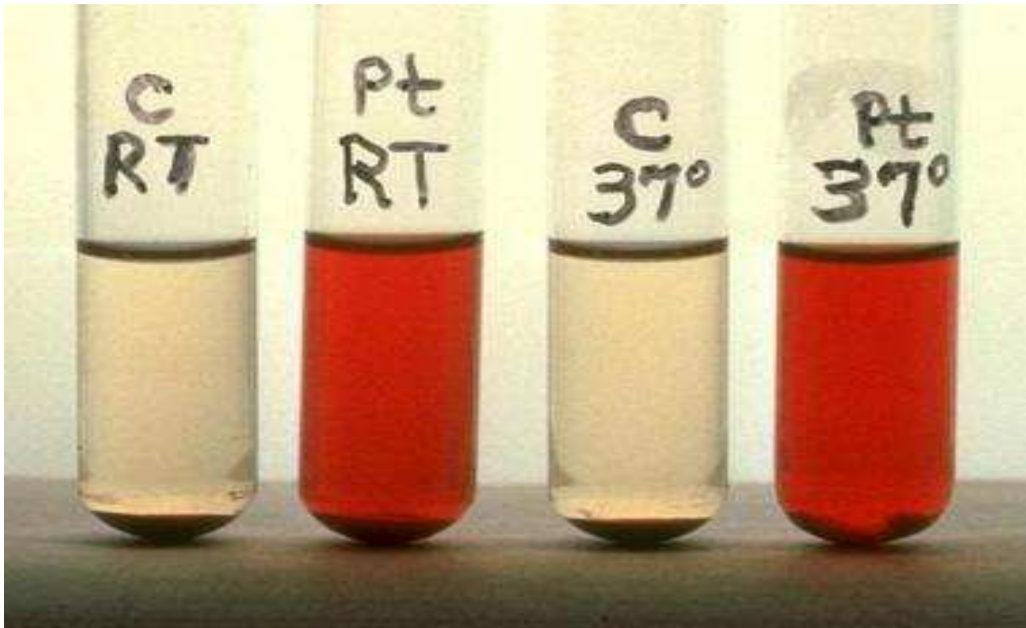


Figure 7 : Test de Ham-Dacie [73].

Ce test est positif quand l'hémolyse est supérieure ou égale à 10%, mais n'a de valeur qu'accompagné de contrôle rigoureux, Il manque de sensibilité : il peut être positif dans la dysérythropoïèse congénitale type II, problème de faux négatifs lorsque le taux des globules rouges atteints est inférieur à 5 %, ne permet pas de faire la différence entre le type III et le type II. Mais le Test de Ham reste plus spécifique que le test au sucrose [72].

2.2 Test d'hémolyse à faible force ionique = test au sucrose

La fragilité érythrocytaire est recherchée en incubant à température ambiante des hématies préalablement mises en suspension saline dans une solution comportant du sucrose 10% (au faible pouvoir ionique) , qui favorise la fixation du complément sur la membrane des globules rouges , avec un pH 6,3 (apport énergétique) et du sérum frais (apport de complément) provenant d'un individu normal ABO compatible [72], une centrifugation est effectuée et l'hémolyse du surnageant est évaluée visuellement.

C'est un test de dépistage, simple très sensible, sa négativité rend l'HPN très peu probable sauf s'il s'agit d'un sujet récemment transfusé ou si l'on a utilisé de l'héparine ou de l'EDTA comme anticoagulant [65]. Il est positif quand l'hémolyse est supérieure ou égale à 10 %, ce test est moins spécifique pour hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), mais plus sensible que le test de Ham.

Ces deux examens ne testent que la population érythrocytaire, ce qui est source de faux-négatifs. En effet, en cas de transfusions et d'hémolyse aigue, les hématies pathologiques sont diluées ou détruites avec ces tests peu sensibles et peuvent ne pas être détectés.

C'est pourquoi ces tests ne sont plus utilisés de nos jours.

3. Autres examens biologiques

D'autres examens sont à réaliser pour rechercher une hémolyse, un retentissement sur la fonction rénale et une hémopathie associé [74] :

- ✓ Un hémogramme : pour rechercher des cytopénies, une anémie microcytaire ferriprive (par perte urinaire), un frottis sanguin pour rechercher des anomalies morphologiques des hématies (absentes en cas d'HPN) et des anomalies morphologiques faisant suspecter une myélodysplasie ;
- ✓ Quantification des réticulocytes (augmentés en cas d'hémolyse ;
- ✓ Dosage des LDH (lactate déshydrogénase), augmentés en cas d'hémolyse ;
- ✓ Dosage de la bilirubine libre, augmentée en cas d'hémolyse ;
- ✓ Dosage de l'haptoglobine, effondrée en cas d'hémolyse ;
- ✓ Dosage de l'urée et de la créatinine, pour rechercher une insuffisance rénale ;

- ✓ Un myélogramme, avec parfois une biopsie ostéo-médullaire, lors de cytopénies pour une analyse morphologique et cytogénétique à la recherche d'une hémopathie : aplasie médullaire ou myélodysplasie.

4. Cytométrie en flux : vers une meilleure détection du clone

4.1 La cytométrie en flux : test diagnostic de référence

La cytométrie est devenue le test de référence pour le diagnostic de cette maladie. Elle est plus sensible et plus spécifique que les autres méthodes [75-80]. Elle permet de détecter et de quantifier la population pathologique dans les différentes populations hématopoïétiques.

Comme on l'a vu, l'HPN étant une maladie de la cellule souche hématopoïétiques, le clone peut être détecté dans toutes les cellules sanguines.

Ainsi grâce à des anticorps monoclonaux, le clone HPN est mis en évidence. Il est déficient en certains antigènes de surface, les antigènes à ancrage GPI. Les marqueurs GPI-liés les plus utilisés sont énumérés dans le tableau 2 [78].

Les cytomètres sont de plus en plus performants et les derniers appareils agréés pour un usage diagnostique sont capables d'analyser jusqu'à dix fluorescences et de collecter jusqu'à un million d'événement assez rapidement. Ce niveau accru de sophistication signifie que les petites populations de cellules anormales peuvent être détectées plus facilement. Cependant leur signification reste à déterminer.

Il n'existe pas de consensus sur la façon de procéder et le choix des anticorps monoclonaux dépend des pratiques de chaque laboratoire [76,80-82].

De nouvelles données prévenant de l'expérience de laboratoire et de programmes d'assurance qualité indiquent que certains réactifs sont inférieurs aux autres. Ainsi, bien que les CD55 et CD59 soient largement utilisés

(anticorps historiques et présents sur toutes les cellules hématopoïétiques) pour la détection de neutrophiles, monocytes et GR, ces réactifs ne sont pas aussi performants que les anticorps dirigés contre d'autres antigènes [79,83,84].

On admet généralement qu'il faut étudier, sur le sang, au moins 2 populations sanguines et utilisé sur chacune d'entre elles au moins 2 marqueurs à ancrage GPI (pour éviter les déficits congénitaux rares [85]). Le seuil de sensibilité de la technique pour tout laboratoire est de 5%

La cytométrie en flux permet de détecter les différents types de cellules pathologiques. En effet, en fonction des mutations du gène PIG-A, nous obtenons une expression différente des marqueurs GPI-liées à la surface cellulaire : les cellules types III ont un déficit complet et les cellules de type II ont un déficit partiel [1]. L'étude des GR permet de bien visualiser cette différence d'expression (figure8). La signification de ces différents types cellulaires pathologiques reste à être élucidée.

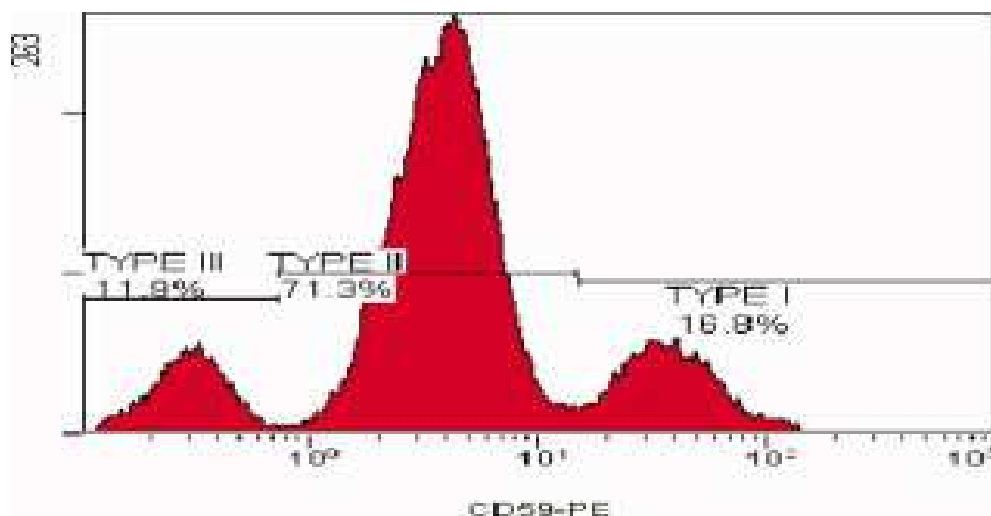


Figure 8 : expression du CD59 sur les GR chez un patient HPN, illustration des hématies de type I, II et III [3].

L'HPN est une maladie rare dont le diagnostic correct est essentiel pour une prise en charge optimisée des patients. Il existe certaines particularités et défis posés par le diagnostic biologique de cette maladie : contrairement à de nombreuses procédures immunophénotypiques, on met en évidence un déficit de marquage des cellules. Et lorsque que l'on cherche à augmenter la sensibilité, c'est-à-dire à détecter un petit clone, il faut être très vigilant pour éviter les faux-positifs. Si la fenêtre d'analyse est mal construite ou contaminée par une deuxième population, il est possible de conclure à tort à l'existence d'un clone.

Tableau II : exemples de protéines à ancrage GPI [30].

Antigène	Fonction	Distribution cellulaire
CD14	Récepteur endotoxinique (récepteur lipopolysaccharide)	Expression forte par les monocytes ; faible par le PNN
CD16	Récepteur de faible affinité pour Fc des IgG :FcγRIII (2 isoformes)	PNN (polymorphisme, ancrage GPI) cellules NK et lymphocytes T (forme transmembranaire)
CD24	Molécule d'adhésion	Lymphocytes B et PNN
CD48	Possible récepteur /ligand se liant au CD2	Lymphocyte et monocytes
CD52	Inconnu	Lymphocyte et monocytes (faible)
CD55 (DAF)	Régulation du complément ; limite la formation du C3 convertase	Toutes les cellules hématopoïétiques
CD58	Adhésion ; signal de co-stimulation	Toutes les cellules hématopoïétiques, une forme transmembranaire et une GPI-liée
CD59 (MIRL)	Inhibe la formation du complexe d'attaque membranaire et protège de la lyse médiée par le complément	Toutes les cellules hématopoïétiques et aussi non- hématopoïétiques
CD66b	Adhésion homo/heterophile ; activation cellulaire	PNN, cellules épithéliales
CD87 (uPAR)	Convertit le plasminogène en plasmine	Cellules T, NK, monocytes, PNN, et les cellules non- hématopoïétiques; expression faible et augmentant avec activation

4.2 Principes de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est définie comme l'étude de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule traversant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- ✓ Aux propriétés optiques intrinsèques des particules dépendant des phénomènes de diffusion lumineuse liés à leurs dimensions, à leur structure interne, ou à l'auto-fluorescence de certaines cellules ;
- ✓ Aux propriétés optiques induites de la fluorescence obtenues par marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Pour fonctionner, un cytomètre en flux nécessite la combinaison :

- ✓ D'un réseau fluidiques avec une veine liquide s'écoulant à vitesse constante qui entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant l'échantillon ;
- ✓ D'un banc optique avec une ou plusieurs sources lumineuses et ses détecteurs du type photodiode (pour la diffusion de la lumière) et des photomultiplicateurs et filtres optiques qui permettent de quantifier les diverses fluorescences émises par chaque cellule ;
- ✓ D'électronique : un microprocesseur qui convertit les signaux électroniques en signaux numériques, coordonne les données, prépare les représentations graphiques et les analyses statistiques.

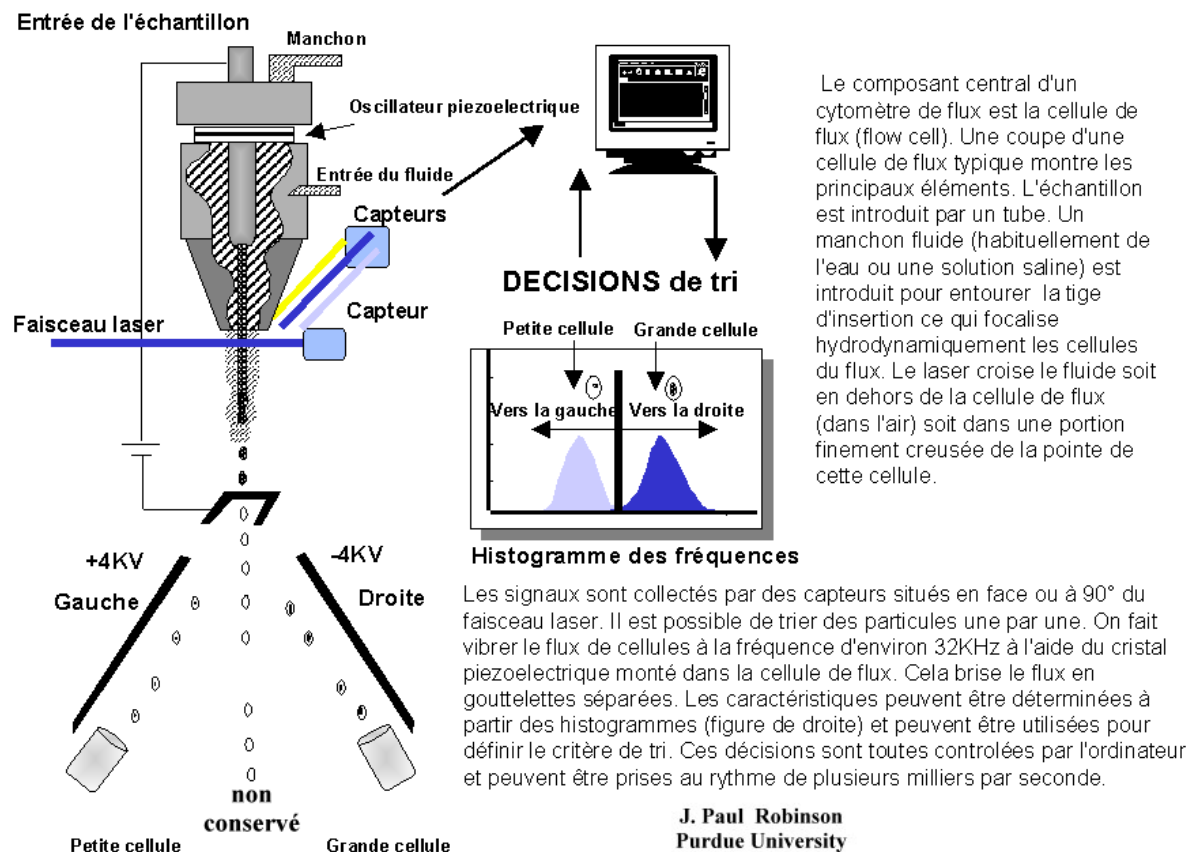


Figure 9 : représentation des 3 composants d'un cytomètre : le fluide, l'optique et l'électronique [86].

Ces signaux, séparés par des filtres optiques, sont collectés par des photomultiplicateurs, puis amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres), également appelés Dot Plots, sur une ou plusieurs populations cellulaires dont les propriétés phénotypiques sont ainsi évaluées.

Ces dernières années de nombreuses améliorations ont été apportées à cet outil, le rendant très performant pour le diagnostic et le suivi de pathologies. ces améliorations portent sur le système fluide, le système optique notamment avec les fibres optiques, le système informatique qui permet de stocker et d'analyser plus d'événements et sur l'utilisation de nouveaux fluorochromes.

4.3 Recommandations pour la cytométrie en flux dans le diagnostic et la gestion de l'HPN

Tableau III: Recommandations pour la cytométrie en flux dans le diagnostic et la gestion de l'HPN [52].

<p>Pour les patients présentant des signes cliniques d'hémolyse (HPN classique et HPN / anémie aplasique)</p> <p>_ Au moment du diagnostic, l'analyse par cytométrie en flux est recommandée à la fois pour les érythrocytes* et les granulocytes**.</p> <p>_ Après l'établissement du diagnostic, l'analyse par cytométrie en flux est recommandée tous les 6 mois pendant 2 ans puis annuellement si les paramètres sont stables.</p> <p>_ S'il existe des signes de progression clinique (ou d'amélioration), une analyse plus immédiate doit être effectuée.</p> <p>Pour les patients souffrant d'anémie aplasique, anémie réfractaire ou SMD*** sans signe clinique d'hémolyse</p> <p>_ Au moment du diagnostic, l'analyse des érythrocytes et des granulocytes par cytométrie en flux de haute précision.</p> <p>_ Chaque année, même en l'absence de signes cliniques d'hémolyse (y compris les patients traités par thérapie immunosuppressive).</p> <p>* Mieux vaut les effectuer avant la transfusion ou, si cela est cliniquement possible, au cours d'une période d'abstinence de transfusion. Les résultats de l'analyse des érythrocytes doivent indiquer le pourcentage de type I, de type II et de type III des globules.</p> <p>** Analyse des granulocytes est nécessaire pour les 2 raisons suivantes:</p> <p>(1) analyse fournit une meilleure estimation de la taille du clone HPN,</p> <p>(2) l'analyse n'est pas affectée par la transfusion de globules rouges.</p> <p>*** Quel que soit la cellularité de la moelle.</p>

4.4 Stratégie d'analyse

L'analyse par cytométrie de flux doit être effectuée avec des échantillons de sang périphérique prélevés dans des tubes EDTA dans les 24 à 48 heures. Ces échantillons doivent être conservés à température ambiante pendant 24 heures (+ 4 °C pendant 48 heures). Cependant, il est recommandé de traiter au plus court intervalle de temps possible pour obtenir des résultats précis. Comme l'expression des protéines GPI ancrées dans les cellules hématopoïétiques est faible, l'examen de la moelle osseuse n'est pas recommandé [87].

La 1^{re} étape est la recherche de cellules déficientes en marqueurs GPI-liés parmi les PNN avec confirmation sur les monocytes. En l'absence de clone significatif détectable, l'exploration est arrêtée ; en présence de cellules déficientes, la 2^e étape est la recherche de cellules déficientes en marqueurs GPI-liés parmi les globules rouges (GR), permettant de distinguer plus facilement les patients ayant un déficit partiel de ceux ayant un déficit total. Il faut noter qu'il existe un mosaïcisme du phénotype chez un même patient avec des cellules de type I (normales), des cellules de type II (ayant un défaut d'expression partiel) et des cellules de type III (avec absence d'expression). Sur les PNN et les monocytes, il est possible d'utiliser plusieurs combinaisons d'Ac, selon le cytomètre.

Les marqueurs de sélection (gating) sont le CD45/SCC puis le CD33 et le CD15 (PNN) et le CD64 (monocytes). Les marqueurs GPI-liés sont l'Ac anti-CD24 sur les PNN et l'anti-CD14 sur les monocytes, avec du FLAER, réactif se liant de manière spontanée sur la molécule GPI.

Pour les GR, les marqueurs de sélection sont le CD235a et le FCS/SSC, et le marqueur GPI-lié, le CD59 [88].

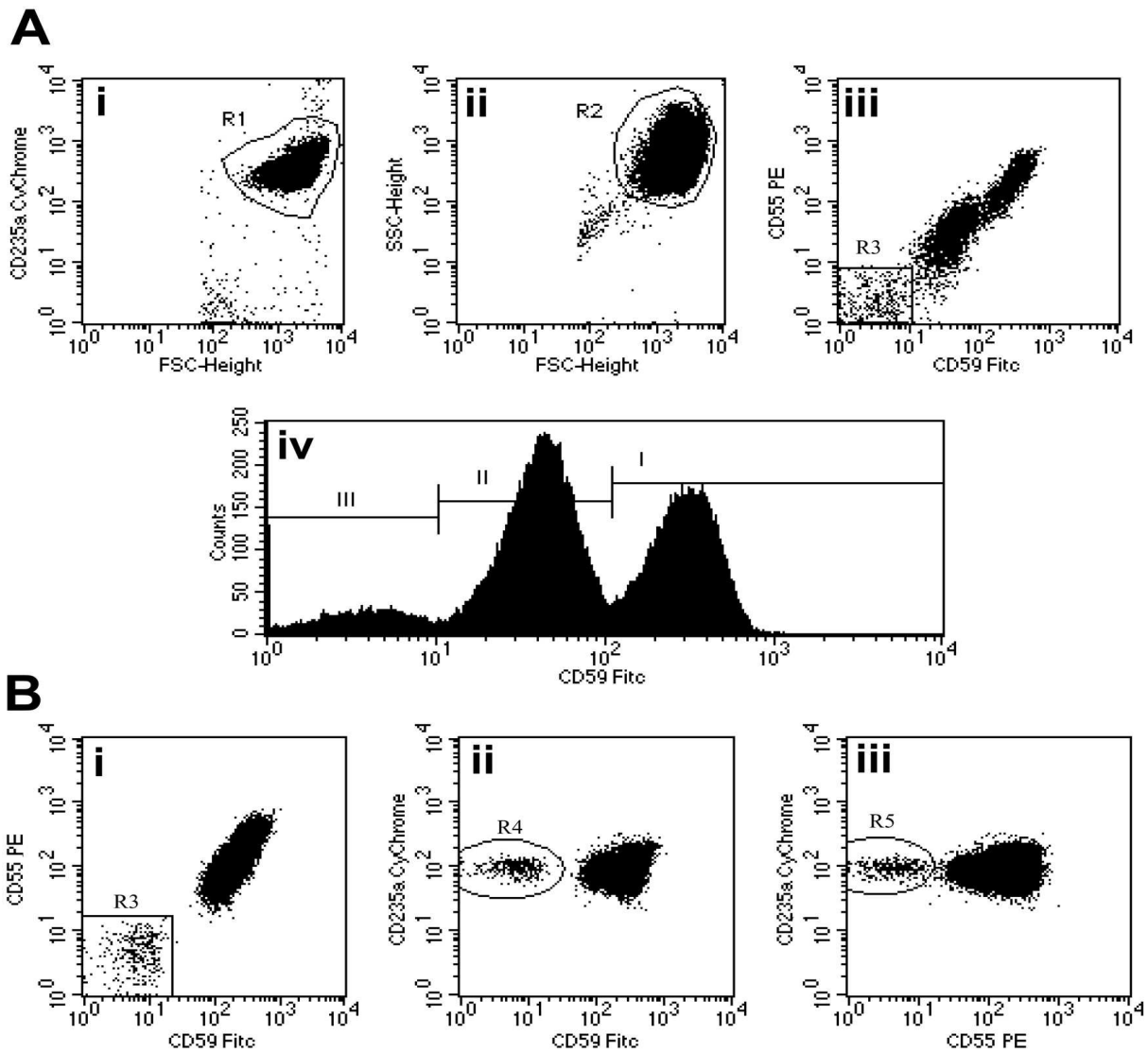


Figure 10 : L'analyse par cytométrie en flux de globules rouges dans HPN en utilisant une combinaison d'anti-CD59 FITC, anti-CD55 PE et anti-CD235a CyChrome [52].

(Ai-ii) des parcelles de cytométrie en flux montrent la stratégie de déclenchement pour l'identification d'une population pure de cellules rouges.

Une zone initiale (R1) est fixé sur les événements CD235a FSCHigh+, Une deuxième région (R2) est ensuite tirée autour des logFSC / CSE caractéristiques de ces cellules. Seuls les événements qui répondent à ces deux critères sont analysés. (Aiii) CD59 et CD55 expression bivariée sur ces événements érythroïdes, une petite population de cellules complètement déficientes (type III) sont détectées (région R3 = 8,0%).

(AIV) Histogramme d'analyse de l'expression CD59 montre également une population importante de cellules partiellement déficientes (type II) comprenant 53,9% du total. Type I (expression normale) cellules comprennent 38,1% du total. (Bi-iii) détection d'un clone de cellules rouges très faible chez un patient présentant une HPN-sc/ anémie aplasique. La cellule rouge clone HPN comprend 0,4% des cellules totales rouges (Bi). La confiance que cette population n'est pas un artefact est représenté simultanément par CD59 (Bii) et CD55 (Biii) déficience et forte expression de CD235a.

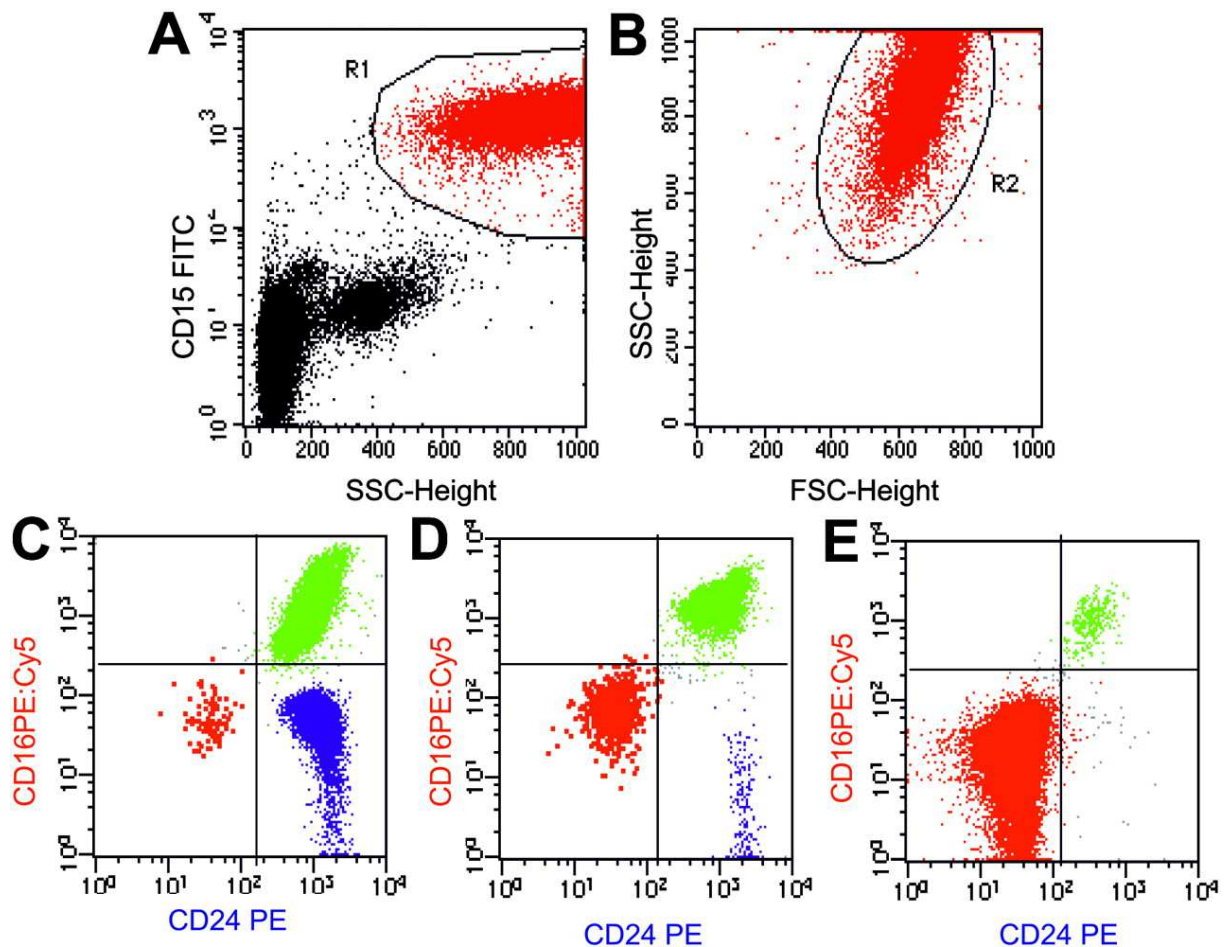


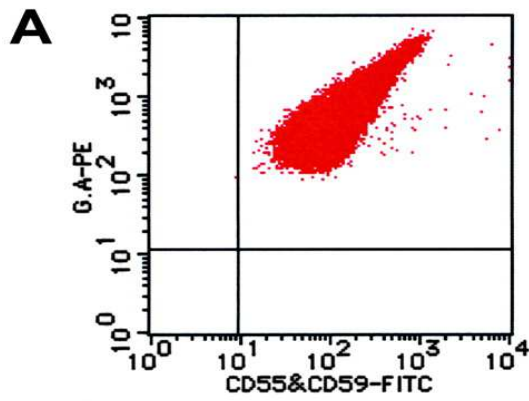
Figure 11 : L'analyse par cytométrie en flux de granulocytes dans HPN en utilisant une combinaison de FITC anti-CD15, anti-CD24 PE et anti-CD16 PE: Cy5 [52].

Les courbes de cytométrie de flux (A-B) montrent la stratégie de détermination pour identifier une population pure de granulocytes basée sur des caractéristiques de diffusion de lumière et un marqueur de lignée transmembranaire (CD15). Une région initiale (R1) est réglée sur CD15a + SSCHigh événements (A). Une deuxième région (R2) est ensuite tracée autour des caractéristiques FSC / SSC de ces cellules pour affiner encore la procédure de passage (B). Seuls les événements qui répondent à ces deux critères sont analysés. (C-E) En utilisant cette combinaison, les éosinophiles normaux (bleu) peuvent être clairement séparés des cellules PNH (rouge) et granulocytes normaux (vert). Les parcelles sont de 3 patients représentatifs avec PNH. (C) Un petit clone granulocytaire de PNH de 0,18% des granulocytes totaux chez un patient souffrant d'anémie aplastique (PNH-sc / anémie aplastique). (D) Un clone granulocytaire de PNH plus grand de 8,7% chez un patient présentant une anémie aplastique (PNH / anémie aplastique). (E) Le tracé provient d'un patient présentant une PNH classique et présente un grand pool de granulocytes de HNP (98,8%). Dans ce cas, la majorité de l'hématopoïèse est dérivée de cellules souches PNH. Il existe une certaine production résiduelle de granulocytes normaux (le 1% de cellules qui sont CD16 + CD24 +) et cette population sert de contrôle positif interne pour la coloration d'anticorps. Illustration renforcée par A. Y. Chen.

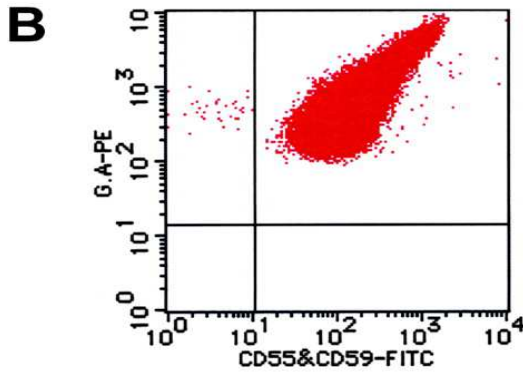
4-5 Cytométrie en flux de haute précision

Une variation de 3~15 % du taux d'expression du CD55 et du CD59 peut suffire dans le diagnostic de l'HPN classique, dans le cas des HPN sub-clinique, le clone représente souvent moins de 0,1 % de la population étudiée (fig. 11). La cytométrie standard, monochromatique, n'est plus suffisante, il faut recourir au moins à une étude en deux couleurs avec un fenêtrage d'exclusion précis pour éliminer toute trace de fantômes de cellules lysées durant la préparation [67].

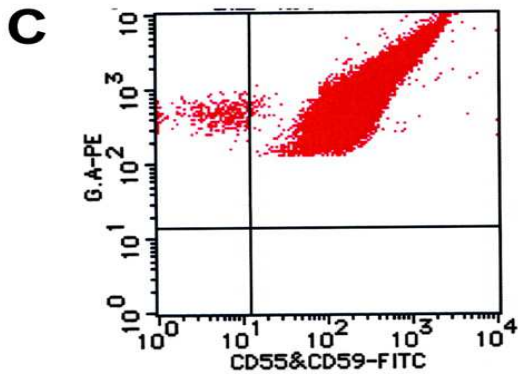
Il est préférable de coupler le CD55 et le CD59 au même fluorochrome pour exclure d'emblée les déficits isolés d'un seul de ces deux marqueurs. Cette technique permet de gagner 3 logs de précision ainsi que de détecter des évènements aussi rares que 0,005 % de la population comptée. Pour cette raison, l'analyse par cytométrie en flux de haute précision est recommandée chez ces patients à la fois au moment du diagnostic et de façon annuelle pendant et après le traitement, même en l'absence de signes cliniques ou biochimiques d'hémolyse (tableau 3).



Normal control (no GPI-AP deficient erythrocytes observed)



Patient with PNH-sc/aplastic anemia with 0.04% GPI-AP deficient erythrocytes



Patient with PNH-sc/aplastic anemia with 0.36% GPI-AP deficient erythrocytes

Figure 12: L'analyse par cytométrie en flux de haute précision des érythrocytes [52].

A. contrôle normal (pas d'érythrocytes GPI-AP déficients).

B. patient avec HPN-sub-clinique/anémie aplasique avec 0,04 % d'érythrocytes GPI-AP déficients.

C. patient avec HPN-sub-clinique/anémie aplasique avec 0,36 % d'érythrocytes GPI-AP déficients.

4.6 Présentation des résultats

Les objectifs de l'examen sont de rechercher la présence d'un clone HPN et de le quantifier au sein des leucocytes et des GR (taille du clone) [88].

Le compte rendu doit préciser la nature de l'échantillon, les renseignements cliniques éventuels, les marqueurs de sélection (gating) utilisés, les marqueurs GPI-liés évalués, la sensibilité de la méthode (PNN et GR), à compléter par la sensibilité de l'examen si elle est inférieure.

En l'absence de clone HPN, conclure avec une formulation claire (éviter les « positif / négatif »).

En présence d'un clone HPN, il faut en préciser la taille dans chaque catégorie de cellules : type II, type III (type II + III = taille totale du clone).

La conclusion est dictée par la taille du clone au sein des PNN :

- si $HPN_{II+III} < 0,1 \%$: « présence de rares cellules présentant un déficit en protéines GPI-liées » ;

- si $HPN_{II+III} > 0,1 \%$ et $< 1 \%$: « présence d'un clone HPN minoritaire estimé à x % sur les PNN » ;

- si $HPN_{II+III} > 1 \%$: « présence d'un clone HPN estimé à x % sur les PNN ».

Et si le clone est confirmé au sein des monocytes et des GR, rendre « confirmé sur les monocytes(x %) et sur les GR (x %) ».

Théoriquement, dans la forme classique, le clone HPN est $> 50 \%$ des PNN (hémolyse+++). Dans la forme associée à une anomalie médullaire, le clone HPN est $< 30 \%$ (avec manifestations des anomalies de l'hématopoïèse : cytopénie, anémie arégénérative...). Dans la forme « infra-clinique », le clone HPN est mineur, $< 1 \%$ (sujets sains : jusqu'à 0,003 %) ; les patients sont pauci ou a symptomatiques (une évolution est possible mais rare) [88].

4.7 Exemples de patients HPN diagnostiqués au Laboratoire Central d'Hématologie de l'Hôpital Ibn Sina:

- HPN FC114/16 H.S
- Sur les GR

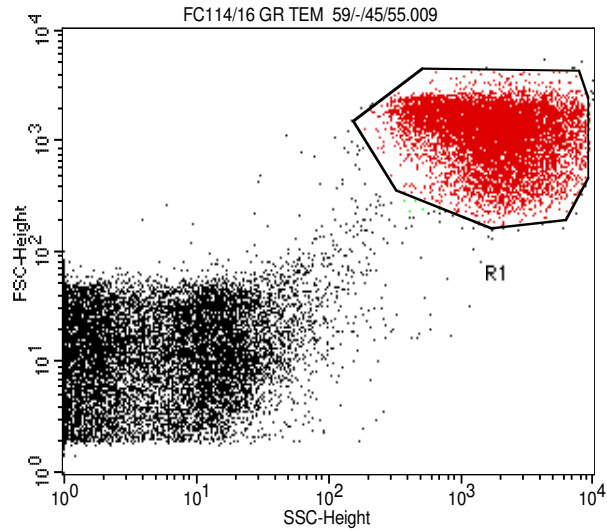


Figure 13: diagramme représentant les GR du patient [89]

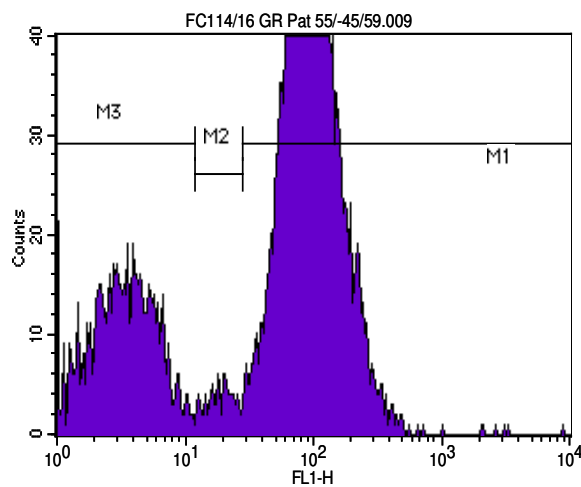


Figure 14 :analyse par cytométrie en flux des GR du patient [89]

Erythrocytes à déficience partielle en CD59 TYPE II (M2) : 2.10% (témoin a 0.29%+/-0.3).
Erythrocytes à déficience complète en CD59 TYPE III (M3) : 22.50% (témoin a 0.15%+/-0.16).
Clone HPN Erythrocytaire (TYPE II+TYPE III) : 24.60% (témoin a 0.44%+/-0.55).

- **Sur les PNN**

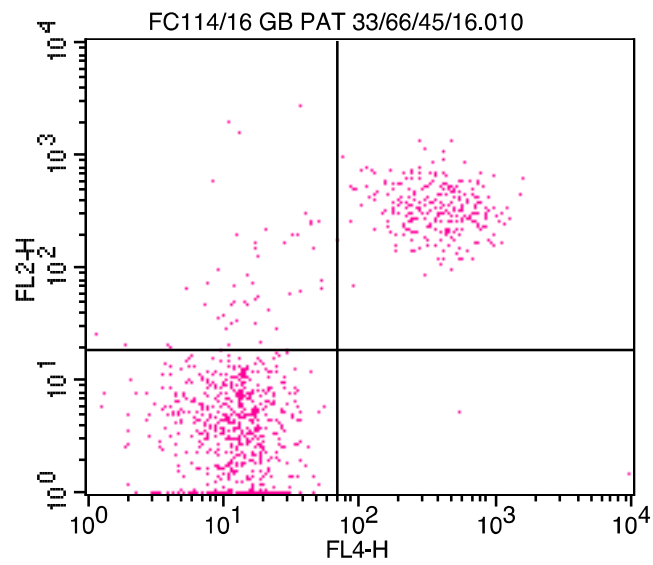


Figure 15 : analyse par cytométrie en flux des PNN du patient [89]

La population CD16-/CD66b- est de 66.46% (LL sur le diagramme) Témoin a 0.27% +/- 0.5

➤ **FC56/15 D.K**

- **Sur les GR**

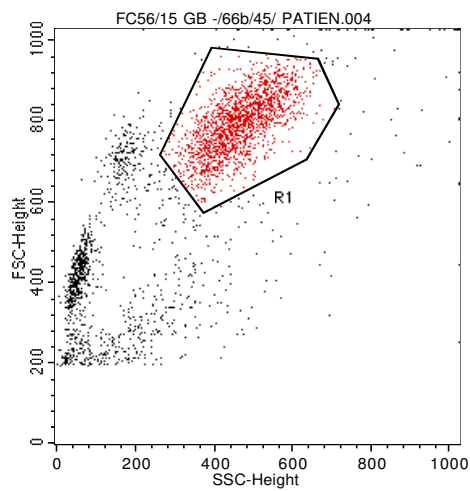


Figure 16: diagramme représentant les GR du patient [89]

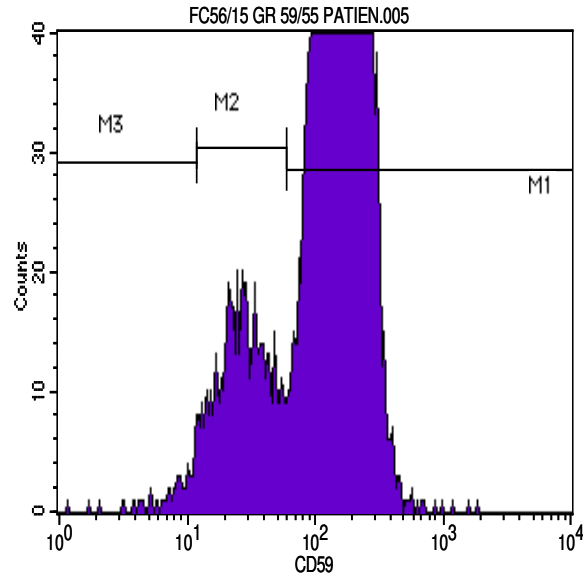


Figure 17 : analyse par cytométrie en flux des GR du patient [89]

Erythrocytes à déficience partielle en CD59 TYPE II : 11.58%(témoin a 0.29%+/-0.3).

Erythrocytes à déficience complète en CD59 TYPE III : 0.15%(témoin a 0.15%+/-0.16).

Clone HPN Erythrocytaire (TYPE II+TYPE III) : 11.73% (témoin a 0.44%+/-0.55).

- **Sur PNN**

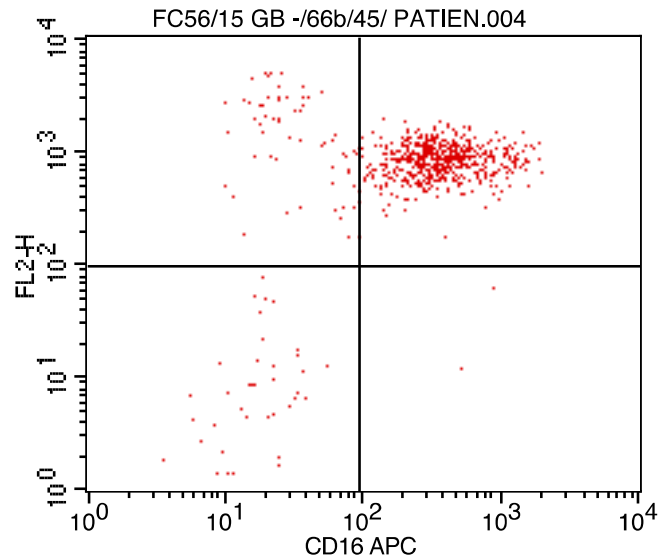


Figure 18 : analyse par cytométrie en flux des PNN du patient [89]

La population CD16-/CD66b- est de 5.37% (LL sur le diagramme) Témoin a 0.27% +/- 0.5

4.8 Suivi des patients présentant un clone HPN

Tableau IV: suivi des patients présentant un clone HPN [3,90].

Patients non traités	Stabilité clinique Survenue d'une complication	Surveillance annuelle Réévaluer la taille du clone par CMF (suspicion de majoration : évolution vers la forme classique notamment)
Patients traités	Patients traités par l'éculizumab	Surveillance mensuelle : numération sanguine Taux de réticulocytes Bilirubine LDH Surveillance annuelle du clone par CMF En cas de suspicion d'hémolyse : Test de Coombs

4.9 Le FLAER

Plus récemment a été développé le FLAER (Fluorescent AERolysin) issu d'une pro-toxine bactérienne. Il ne s'agit donc pas d'un anticorps monoclonal. *Aeromonashydrophila* produit une pro-toxine : la pro-aerolysine, qui après clivage protéolytique de la partie C-terminale (par une enzyme membranaire de la cellule cible) libère la forme active, l'Aerolysine [91,92].

Le peptide final est cytolytique (formation de canaux).

Cette pro-toxine a la spécificité de se lier à l'ancre glycosyl-phosphatidylinositol elle-même [93], cependant sa fixation est moindre sur les ancres des GR (CD55 et CD59 à cause de leur glycosylation différente).

Initialement, la pro-aerolysine a été utilisée pour enrichir les petits clones HPN en lysant les cellules normales. Par la suite, une version non-lytique couplée à un fluorochrome (Alexa Fluor 488) a été développée.

Des études ont montré que le FLAER est plus sensible que le CD59 pour la détection de petits clones HPN [94].

Le principal avantage du FLAER est qu'il reconnaît toutes les ancrées GPI des PNN et des monocytes. Ce seul peptide permet d'étudier au moins 2 populations avec une bonne sensibilité, surpassant ainsi les marqueurs historiques CD55 et CD59 pour l'étude de ces populations mais pas pour les GR [94].

Une première forme lyophilisée avait été produite malheureusement avec des problèmes de stabilité, limitant son utilisation [80,94]. Une forme liquide, ultérieurement commercialisée, s'est avérée plus stable. Cette solution n'est disponible que depuis septembre 2009.

5. Autres approches diagnostiques

➤ L'analyse de moelle osseuse

L'analyse morphologique de l'aspiration, la biopsie et la cytogénétique de la moelle osseuse sont nécessaires pour la classification appropriée, comme l'HPN qui est souvent observés en association avec des syndromes d'insuffisance médullaire [95] et parfois avec des myélopathies clonale [96,97]. Bien que des anomalies caryotypiques non aléatoires associés à l'HPN n'aient pas été identifiées, l'analyse cytogénétique est recommandée pour les deux raisons suivantes:

- 1) l'analyse d'un grand nombre d'échantillons en utilisant la technologie moderne, peut permettre l'identification de maladies spécifiques et d'anomalies,
- 2) des anomalies caryotypiques non aléatoires associés à d'autres processus pathologiques sous-jacents peuvent aider à catégoriser les patients individuels

➤ **Mutations PIGA**

Chez les patients atteints d'HPN le déficit GPI est dû à une mutation somatique dans l'acquisition PIG-A. Par conséquent, la documentation de la mutation PIG-A confirmerait le diagnostic de l'HPN. En raison de difficultés techniques, l'identification des mutations PIG-A a été limitée dans le cadre de la recherche, cependant de nouvelle technologie peuvent aider à la détermination clinique d'éventuelles mutations PIG-A [98].



**TRAITEMENT ET
RECOMMANDATIONS POUR
LES URGENCES**

1. Traitement

Le traitement dépend du type de catégorie d'HPN et de la symptomatologie. En cas d'aplasie médullaire/HPN, il faut traiter l'aplasie pour avoir un effet sur le clone. En cas d'HPN classique, le traitement dépend des complications. Il peut être constitué uniquement de transfusions de culots globulaires en cas d'hémolyse aiguë ou par un traitement inhibant le complément...

Le seul traitement curatif est la greffe allogénique de moelle osseuse qui n'est proposée qu'aux jeunes patients souffrant d'aplasie médullaire avec un greffon HLA-identique ou bien en dernier recours d'une HPN classique avec des thromboses récidivantes menaçant le pronostic vital [99-104]. Cette thérapeutique est grevée d'une lourde morbidité et mortalité.

Il est possible d'atténuer les symptômes de l'HPN et de prendre en charge les complications quand elles surviennent.

Les traitements utiles sont [105] :

_ Les traitements symptomatiques :

- Transfusions de culots globulaires [106],
- Supplémentations en fer et folates,
- Eviction des facteurs déclenchants (stress, certains médicaments, infections...),
- Traitement rapide des infections (qui déclenchent des poussées d'hémolyse),
- Dérivés nitrés en cas de spasmes [107,108],
- Soutien psychologiques, car il s'agit d'une maladie chronique qui altère la qualité de vie,

_ En cas de thromboses : des HBPM (héparine de bas poids moléculaire) et des AVK (anti vitamine k) sont utilisés en prophylaxie secondaire et peuvent être proposés en prophylaxie primaire avec des antiagrégants plaquettaires, cependant leur efficacité n'est pas démontrée [109-113] ;

_ Androgènes [106], danazol pour diminuer les besoins transfusionnels (contre-indiqué pendant la grossesse et l'allaitement);

_ Corticoïdes [111] sont parfois efficaces. Ils auraient un intérêt dans les formes hémolytiques mais n'auraient pas d'effet sur hématopoïèse. Un traitement de 6 semaines inefficace doit être interrompu. ;

_ Immunosuppresseurs : sérum anti-lymphocytaire, ciclosporine utilisés en cas d'aplasie médullaire ;

_ Le traitement qui a révolutionné la prise en charge de cette maladie est l'éculizumab, un inhibiteur du complément.

1.1 Les traitements classiques

1.1.1 La greffe de moelle osseuse allogénique

La greffe de moelle osseuse allogénique est un traitement curateur de l'HPN.

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques correspond au transfert ou à la transplantation de cellules du système hématopoïétiques d'un individu non malade à un autre individu atteint d'une maladie. Il s'agit d'une technique qui a été utilisée pendant plus de 30 ans dans le traitement de patient souffrant d'un cancer du sang (essentiellement des leucémies aiguës).

Le principe thérapeutique de cette technique est basé sur le transfert des cellules du système immunitaire qui se trouvent dans la moelle osseuse du donneur au patient. Le but de cette greffe est de permettre à un système immunitaire «neuf» de s'établir chez le patient, de cibler les cellules de la maladie et de les éliminer: il s'agit d'une «immunothérapie».

Récemment, les données de 67 cas isolés rapportés et de deux registres internationaux ont été reprises [52]. Les trois indications classiques sont:

- l'aplasie médullaire ;
- les complications thrombotiques répétées ;
- les crises hémolytiques sévères récurrentes.

Le conditionnement recommandé pour la forme aplasique est volontiers peu intensif alors qu'un conditionnement plus myéloablatif est souhaité pour la forme classique. L'incidence de survenue de maladie du greffon contre l'hôte est élevée puisqu'elle représente près d'un tiers des malades en ce qui concerne la forme aiguë sévère et 35% des patients développeront une forme chronique de la maladie. La survie globale à long terme est de l'ordre de 50 à 60% [112].

Certains patients traités avec une transplantation de greffe moelle osseuse syngénique rechute après plusieurs années avec l'HPN. Fait intéressant, le caractère récidivant des cellules HPN est distincts des cellules HPN originale, ce qui suggère qu'une mutation PIGA s'est produite de nouveau chez ces patients.

1.1.2 Les immunosuppresseurs

Le terme immunodépresseur (ou immunosuppresseur) désigne tout ce qui supprime ou qui a la capacité de réduire les réactions immunologiques spécifiques de l'organisme contre un antigène (corps étranger pénétrant dans l'organisme).

Les médicaments immunosuppresseurs sont parfois utilisés en cas d'HPN associée à une aplasie médullaire. Ils sont considérés comme le traitement de norme initial pour les patients qui ont plus de trente ans et pour les patients plus jeunes sans donneur de famille homologue. Les taux de réponse sont de 70 % à 80 %. Le traitement est généralement bien toléré et normalement nécessite seulement une brève hospitalisation. De plus, les cas d'allogreffes de CSH qui

ont été effectuées entre jumeaux monozygotes dans l'indication d'une aplasie médullaire ne sont pas suivis de prise de greffe sauf si le receveur a été préparé à la greffe par un conditionnement immunosuppresseur.

L'aplasie peut être améliorée par un traitement immunosuppresseur qui constitue le traitement de première ligne de la majorité des aplasies médullaires sévères [60]. Le traitement immunosuppresseur des aplasies médullaires associe:

- **le sérum antilymphocytaire (SAL):** Il entraîne une amélioration de l'hématopoïèse dans un délai de 8 à 10 semaines dans 50-70% des cas. On utilise du sérum de cheval ou de lapin immunisé par des lymphocytes humains du sang circulant (globulines antilymphocytaires) ou par des thymocytes (globulines antithymocytaires).

-**la ciclosporine:** elle est associée au traitement par le SAL. Son utilisation nécessite la surveillance de la fonction rénale, elle peut être responsable de douleurs articulaires, de gingivopathies et favorise la survenue d'infections. La ciclosporine améliore la réponse hématopoïétique au SAL mais pas la survie globale (Tableau5) [60].

Tableau V: Etude comparative et randomisée du traitement immunosuppresseur dans le traitement d'aplasies médullaires graves [60].

Temps post-traitement	SAL	SAL + CSA (ciclosporine A)	Significativité
3 mois	30 %	65 %	p<0,03
6 mois	46 %	70 %	p<0,05
Survie	58 %	58 %	Non significatif

Le traitement immunosuppresseur des aplasies médullaires a été accusé de favoriser l'évolution ultérieure d'aplasies médullaires traitées vers :

- l'apparition secondaire d'un clone HPN par mutation du gène PIGA au niveau du chromosome X survenant dans les CSH, phénomène pouvant être associé avec une rechute de l'aplasie médullaire ;

- l'apparition d'un syndrome myélodysplasique liée à la survenue d'anomalies géniques additionnelles dans une CSH anormale lui conférant un avantage de survie et autorisant l'apparition d'un clone myélodysplasique, phénomène associé à une rechute pancytopénique liée à la myélodysplasie [60].

1.1.3 Les androgènes

La dihydrotestostérone (métabolite de la testostérone) stimule la production d'érythropoïétine, augmente le nombre des globules rouges et, en conséquence, l'hématocrite qui est plus élevé chez l'homme que chez la femme.

L'androgénothérapie peut être associée au traitement immuno-suppresseur afin d'améliorer l'érythropoïèse et la mégacaryocytopoïèse. Elle nécessite une surveillance de la fonction hépatique et donne des signes d'androgénie chez la femme. Il faut au moins 3 mois de traitement avant d'observer un effet. Un résultat positif est observé dans 50% environ des cas d'aplasie idiopathique, les

résultats stables et portants sur les 3 lignées hématopoïétiques représentant 25%des cas. Le danazol à effet androgénique faible mérite d’être utilisé dans la maladie de Marchiafava-Micheli, il a pour effet de limiter l’hémolyse [60].

1.1.4 Transfusion Sanguine

Pour les patients atteints d’HPN avec une thrombocytopénie sévère, le traitement par les concentrés plaquettaires réduit nettement la survenue d’hémorragie. Les transfusions de concentrés globulaires demeurent indispensables en cas d’anémie importante ou mal tolérée mais le dogme de transfuser des culots globulaires décomplémentés est largement remis en question [52].

1.1.5 Anticoagulants

En cas de thromboses, un anticoagulant comme l’héparine, est nécessaire en urgence ou les anti-vitamine K, (fig11) peuvent être prescrits pour remplacer l’héparine en traitement de fond. Une étude avec 95 patients présentant un clone

HPN supérieur à 50 % des cellules a comparé l’évolution de 39 patients qui ont reçu une prophylaxie primaire par des antagonistes de la vitamine K (AVK) avec 56 patients qui n’ont pas eu de prophylaxie. L’incidence cumulée de thrombose a été de 0 % chez les patients qui ont eu une prophylaxie versus 36,5% chez les patients qui n’en ont pas eu [114].Malgré le faible nombre de patients et le temps de suivi court, cette étude a mis en évidence une possible indication de prophylaxie primaire chez les patients atteints d’HPN. Néanmoins, dans le groupe traité par des AVK, on observe 2 cas d’hémorragie majeure, dont une hémorragie fatale.

L’observation clinique a démontré que, chez les patients atteints d’HPN, l’anticoagulation orale à long terme est très dangereuse, surtout en raison du risque hémorragique chez les sujets thrombopéniques [114], et souvent

inefficace, avec plusieurs cas décrits de récurrence de thrombose malgré l'anticoagulation par des AVK. À l'heure actuelle, le consensus veut que les patients ayant déjà thrombosés soient anticoagulés à long terme, probablement à vie. Néanmoins, il n'existe aucun essai contrôlé des différents traitements anticoagulants chez les sujets atteints d'HPN.

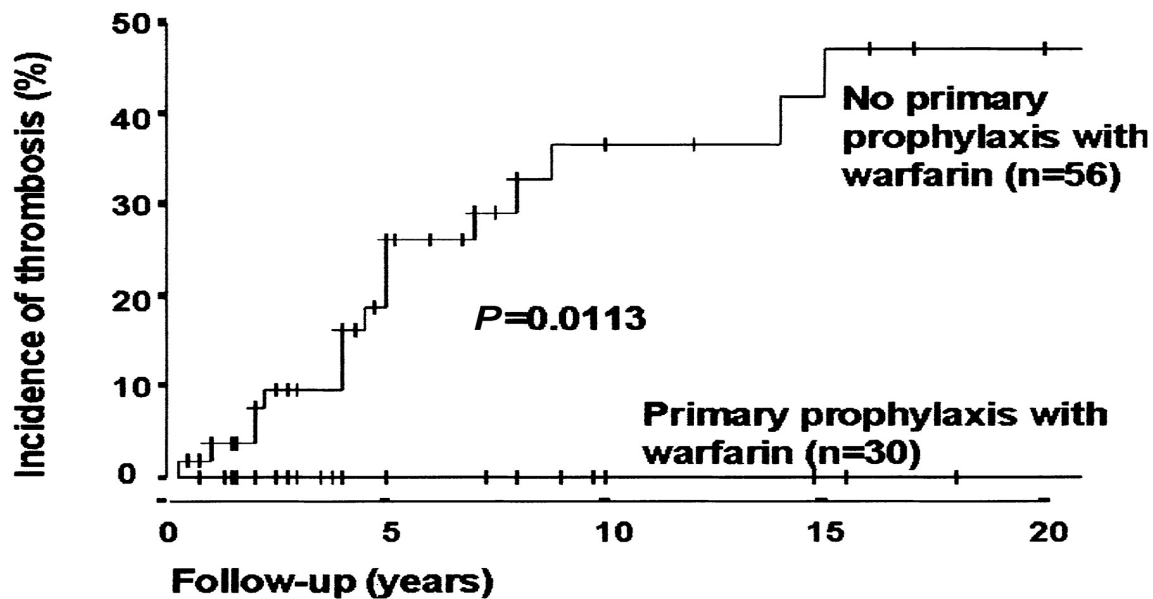


Figure 19 : Prophylaxie de thrombose veineuse par la warfarine [114].

1.1.6 Antiagrégants Plaquettaires

En dehors de l'épisode aigu, L'utilisation d'antiagrégants plaquettaires ou d'anticoagulants est prônée en cas d'antécédent de thrombose [52]. Ce sont des médicaments qui, en empêchant l'agglutination des plaquettes, préviennent la formation des caillots.

1.2 Eculizumab ou Soliris®

Il s'agit d'un anticorps monoclonal recombinant humanisé IgG2/4K. Sa cible thérapeutique est la fraction C5 du complément dont il inhibe la fraction

terminale du complément en bloquant la génération de l'anaphylatoxine C5a et du complexe d'attaque membranaire cytolitique. C'est le premier médicament spécifique de l'HPN [11].

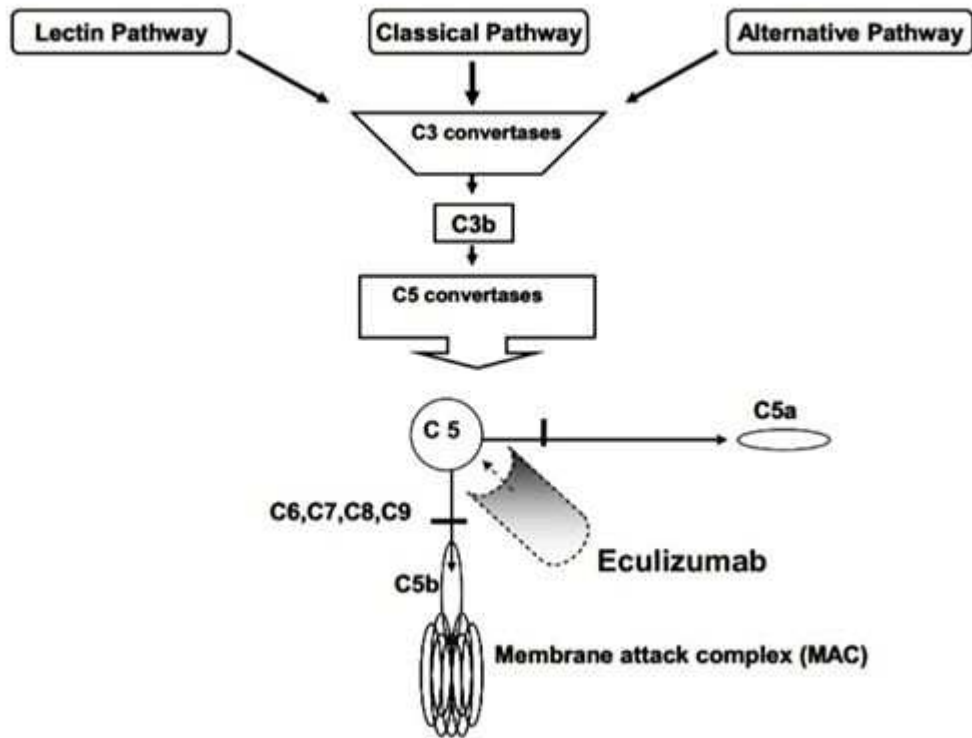


Figure 20 : mécanisme d'action de l'éculizumab [115].

L'éculizumab est indiqué dans le traitement des HPN classique hémolytiques.

L'efficacité et la tolérance de l'éculizumab ont été évaluées chez 195 patients HPN, avec 11 patients dans une étude ouverte de phase II sur 22 semaines, 87 patients dans l'étude Triumph (essai de 26 semaines, en double aveugle, randomisé et contrôlé versus placebo), 97 patients dans l'étude Sheperd

(étude ouverte de 52 semaines) [10,116,117]. Puis 187 de ces patients ont été inclus dans une étude d'extension à long terme, non contrôlée.

Dans l'étude Triumph, les patients traités par l'eculizumab ont présenté une réduction significative de l'hémolyse, des besoins transfusionnels [118] et une augmentation de la stabilisation de l'hémoglobine par rapport aux patients sous placebo.

Dans l'étude Sheperd, il a été observé une baisse de l'hémolyse intravasculaire (mesurée par les LDH) pendant le traitement, une diminution du besoin transfusionnel et une baisse de l'asthénie.

Dans l'étude d'extension à long terme non contrôlée, il a également été observé en plus une diminution du taux d'événements thromboemboliques.

Pour la tolérance, les patients sous eculizumab présentent des céphalées (44.2 %) d'intensité légère à modérée pendant la phase d'administration initiale, des rhinopharyngites (25 %) et des nausées (17,1 %).

Les données pharmacocinétique et pharmacodynamique pour ce traitement sont :

- Une demi-vie après perfusion intraveineuse de 272 heures ;
- Une distribution principalement dans l'espace vasculaire ;
- Une accumulation tissulaire minimale.

Il existe des contre-indications :

- Une hypersensibilité à l'eculizumab, aux protéines murines ou à l'un des excipients ;
- Les infections à méningocoque non résolues, ou l'absence de vaccination à jour contre *Neisseriameningitidis*, ou un déficit immunitaire connu ou suspecté du complément.

Ce produit est conditionné dans un flacon de 300mgde solution à diluer pour perfusion. Il doit être utilisé sous surveillance, avec une équipe ayant l'expérience de la prise en charge des troubles hématologiques.

Le schéma thérapeutique recommandé est le suivant ;

Tableau VI : schéma thérapeutique des patients traités par éculizumab [119].

Avant Traitement	Traitement									
	Semaine	Phase initiale					Phase d'entretien			
≥ 2 semaines avant mise en route du traitement : vaccination contre Nesseriameningitidis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Puis toutes les 2 semaines par la suite
	Eculizumab Dose	600 mg	600 mg	600 mg	600 mg	900 mg	–	900 mg	–	900 mg
	Nombre de Flacons	2	2	2	2	3	–	3	–	3

Il s'agit d'un traitement à vie

Les précautions d'emplois sont :

- Une vaccination anti-méningocoque ;
- Une antibiothérapie prophylactique par la pénicilline V ;
- Une surveillance biologique de l'hémolyse intravasculaire (taux LDH) ;
- En cas d'interruption ou arrêt du traitement, la surveillance doit être maintenue pendant au moins 8 semaines. Une hémolyse grave est associée à un taux de LDH plus élevé que le taux avant traitement et à un des signes suivant : une baisse de plus de 25 % de la taille du clone des hématies en une semaine (sans transfusion), un taux d'hémoglobine inférieur à 5 g/dl ou une baisse de 4 g/L en 1 semaine, un angor, une

modification de l'état mental, une augmentation de 50 % du taux sérique de créatine ou une thrombose ;

- En cas d'apparition d'une hémolyse grave, les traitements suivants doivent être envisagés : transfusions de culots globulaires, anticoagulants, corticoïdes, et reprise du traitement par eculizumab.

D'après Parker (the lancet.2009) [120] :

Les effets de l'eculizumab sont : un blocage de l'hémolyse intravasculaire médiée par le complément, une réduction des besoins transfusionnels, une amélioration de la qualité de vie, une augmentation du pourcentage des hématies de type III (déficit complet en molécules à ancrage GPI) et une augmentation du risque d'infection à méningocoque (d'où la nécessité d'une vaccination avant de débiter le traitement)

En revanche, l'eculizumab ne permet pas de :

- Eliminer totalement l'anémie et la réticulocytose. Le taux de LDH redevient normal mais l'anémie et la réticulocytose persistent en raison d'une probable hémolyse extravasculaire médiée par l'opsonisation des hématies HPN par le complément C3 activé (il ne bloque pas la formation de la voie alternative du C3 convertase) ;
- Traiter la dysfonction médullaire sous-jacente, c'est pourquoi il s'agit d'un traitement à vie ;
- Détruire les cellules souches mutées en PIG-A, responsable du clone.

Toutefois, l'eculizumab pourrait diminuer le risque thrombotique.

2- Recommandations pour les urgences

2.1 HPN et Grossesse

Les femmes atteintes d'HPN peuvent avoir une morbidité et une mortalité accrue au cours de la grossesse [121]. Une étude rétrospective a montré que,

dans 25% des cas, le diagnostic de l'HPN a été fait au cours de la grossesse, montre un taux de mortalité élevé (5 décès sur 24 femmes). Trois décès ont été attribués à la maladie thromboembolique veineuse et 2 aux infections.

Chez les femmes atteintes d'HPN, l'anémie due à une hémolyse, une insuffisance médullaire sous-jacente, ou les deux s'aggravent souvent pendant la grossesse [109]. En raison de préoccupations de risques pour le fœtus / mère de l'exposition à un traitement potentiellement toxique, la transfusion est le pilier de la gestion. Il n'y a aucune expérience avec les inhibiteurs du complément comme éculizumab dans ce contexte. Une Thrombocytopénie modérée à sévère peut compliquer la grossesse, et des saignements cliniquement significatifs de ce paramètre nécessite une transfusion de plaquettes.

L'incidence de la maladie thromboembolique veineuse cliniquement apparente au cours de la grossesse chez les femmes atteintes d'HPN est d'environ 10% [109], et ces événements sont associés à un risque élevé de mortalité [121]. Similaire chez les patientes non enceintes atteintes d'HPN, les veines hépatiques et cérébrales sont souvent les sites où se déclarent les thromboses. Les patients qui développent une thrombose doit être thérapeutiquement anticoagulée.

2.2 Situations d'urgence

Les problèmes que peuvent poser les patients atteints d'HPN en urgence sont divers, liés au polymorphisme de présentation de la maladie. Il faut savoir reconnaître les symptômes qui peuvent mimer des tableaux chirurgicaux aigus, les vraies urgences de prise en charge (syndrome de Budd Chiari, insuffisance rénale aiguë, thrombose veineuse cérébrale) [122].

2.3 Mesures préventives à prendre

Parmi les mesures préventives on note la prise de température pour déceler la survenue d'une infection, évaluer les facteurs de risque d'accident thromboembolique, faire un bilan martial et évaluer un besoin transfusionnel, localisation et évaluation des douleurs éventuelles, La prudence lors d'une anesthésie générale est recommandée si le patient est sous éculizumab [122].

Tableau VII: Recommandations pour les urgences hospitalières [122]

	Mesures diagnostiques en urgence:	Mesures thérapeutiques immédiates :
<p>Crise douloureuse abdominale Devant un tableau de douleurs abdominales importantes chez des patients qui présentent une HPN, il faut évoquer de principe une crise douloureuse abdominale. Les crises douloureuses abdominales de l'HPN sont d'origine incertaine, probablement causées par des micro-thromboses mésentériques. Les douleurs abdominales peuvent aussi traduire un syndrome de Budd-Chiari ainsi qu'une crise hémolytique.</p>	<p>Essayer par tous les moyens habituels, d'éliminer les tableaux chirurgicaux aigus, en particulier : tableau d'appendicite, de péritonite, ou de colique hépatique. Le problème du diagnostic en urgence du syndrome de Budd-Chiari est décrit après.</p>	<p>des antalgiques simples associés ou non à des antispasmodiques. La morphine sera utilisée en cas de douleur intense (>7/10) avec les précautions d'usage en s'assurant de ne pas méconnaître un tableau chirurgical abdominal.</p>
<p>Syndrome de Budd-Chiari Le diagnostic du syndrome de Budd-Chiari doit être évoqué systématiquement chez un patient présentant des douleurs abdominales accompagnées d'une cytolyse hépatique importante. Le tableau s'accompagne en plus des douleurs abdominales, d'un syndrome ascitique.</p>	<p>Echographie abdominale en urgence</p>	<p>Aucun traitement à initier aux urgences avant le transfert sauf celui d'un rare état de choc Hospitaliser dans un service de réanimation polyvalente</p>

<p>Thrombose veineuse cérébrale Devant des céphalées importantes inhabituelles et résistantes chez un patient atteint d'HPN, avec ou sans signe de localisation, il faut penser systématiquement, à une thrombose veineuse cérébrale</p>	<p>Angio-IRM dans le meilleur délai</p>	<p>Aucun traitement à initier aux urgences avant le transfert sauf la prise en charge de trouble grave de la conscience (coma) Hospitaliser dans un service de réanimation polyvalente</p>
<p>Crise hémolytique et insuffisance rénale aiguë Rechercher systématiquement une insuffisance rénale aiguë en cas de crise hémolytique grave, s'accompagnant souvent d'une fébricule et de douleurs abdominales.</p>	<p>ionogramme sanguin dosage de l'urée et de la créatinine électrocardiogramme (hyperkaliémie)</p>	<p>Hospitaliser dans un service de réanimation polyvalente</p>
<p>Cas particulier des patients traités par Eculizumab Cet anticorps inhibe le complément et les patients sont donc susceptibles de développer des infections graves à méningocoques. Ils ont tous été vaccinés contre le méningocoque et doivent recevoir tous une prophylaxie par pénicilline orale.</p>	<p>Toute fièvre survenant chez ces patients doit faire Systématiquement rechercher une infection à méningocoque (porte d'entrée ORL) réaliser en urgence des hémocultures et au moindre doute une ponction lombaire. Tout tableau de purpura fulminans impose le transfert en réanimation</p>	<p>Hospitaliser dans un service de réanimation polyvalente</p>



L'hémoglobinurie paroxystique nocturne ou maladie de Marchiafava-Micheli se distingue de toutes les autres anémies hémolytiques par deux caractéristiques. Tout d'abord, l'anomalie qui sous-tend la pathologie ne se limite pas aux érythrocytes. Plutôt, l'HPN est une maladie de la cellule souche hématopoïétique. Deuxièmement, elle diffère de toutes les autres anomalies intrinsèques des globules rouges en ce que le processus défectueux est acquis plutôt qu'hérité.

L'HPN résulte d'une mutation somatique du gène PIGA (Phosphatidylinositol Glycane de classe A) impliqué dans la synthèse du Glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui sert d'ancre à de nombreuses protéines membranaires, La mutation de ce gène empêche ou limite la synthèse normale de l'ancre GPI, il en résulte un déficit, partiel ou total en molécules GPI-liées à la surface des cellules sanguines, dont deux, CD55 et CD59, sont essentielles à la protection des cellules sanguines contre l'activité lytique du complément.

Elle peut se présenter sous différentes formes cliniques, anémie hémolytique corpusculaire acquise à test de coombs négatif ; qui peut être associée à une aplasie médullaire et se compliquer de thrombose et d'insuffisance rénale.

Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'un déficit en protéines GPI-liées à la surface d'au moins deux lignées de cellules sanguines. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules anormales. Ce dernier permet de définir la taille du clone de cellules HPN. La cytométrie en flux est l'outil diagnostique de référence, mettant en évidence et quantifiant le déficit total ou partiel des cellules en protéines GPI liées. Sur le plan thérapeutique, la forme classique de la maladie a bénéficié de l'avènement de l'éculizumab, anticorps dirigé contre la fraction C5 du complément.



RÉSUMÉ

Titre : Apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne.

Auteur : Nawal EL OUARDIGHI.

Mots clés : Hémoglobinurie paroxystique nocturne, CD55, CD59, Aplasie médullaire, cytométrie en flux.

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est un trouble rare de la moelle osseuse, causée par une mutation somatique acquise du gène PIG-A nécessaire à la synthèse du glycosylphosphatidylinositol (GPI), protéine d'ancrage membranaire de nombreuses molécules. Cette maladie se caractérise par un déficit de cette ancre GPI qui se traduit par un déficit de molécules GPI-liées dont le CD59 et le CD55 sont les plus importants; Cependant, des mutations alternatives qui causent l'HPN ont récemment été découvertes.

Ce travail va mettre le point sur les dernières actualités concernant l'HPN au niveau de la physiopathologie, du diagnostic biologique et des traitements actuels.

L'HPN se manifeste sur le plan clinique par une hémolyse intravasculaire, On note aussi souvent une insuffisance médullaire ainsi que des épisodes thromboemboliques.

La cytométrie en flux est la méthode de référence pour le diagnostic et le suivi d'HPN.

Eculizumab, un anticorps monoclonal recombinant humanisé anti-fraction C5 du complément, est le traitement de choix pour les patients présentant des manifestations sévères de l'HPN. La transplantation de moelle osseuse demeure le seul remède pour cette maladie. Toute fois elle est réservée aux patients ayant une réponse sous-optimale à l'eculizumab.

ABSTRACT

Title: Contribution of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

Author: Nawal EL OUARDIGHI.

Keywords: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, CD55, CD59, Medullary Aplasia, Flow cytometry

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare disorder of the bone marrow caused by an acquired somatic mutation of the PIG-A gene necessary for the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI), the membrane anchor protein of many molecules. This disease is characterized by a deficiency of this GPI anchor which results in a deficiency of GPI-linked molecules of which CD59 and CD55 are the most important; However, alternative mutations that cause PNH have recently been discovered.

This work will update the latest news regarding PNH in terms of pathophysiology, biological diagnosis and current treatments.

PNH is clinically manifested by intravascular hemolysis. Medullary insufficiency and thromboembolic events.

Flow cytometry is the reference method for PNH diagnosis and monitoring.

Eculizumab, a humanized recombinant monoclonal anti-C5 antibody, is the treatment of choice for patients with severe manifestations of PNH. Bone marrow transplantation remains the only cure for this disease. However, it is reserved for patients with a suboptimal response to eculizumab.

الملخص

العنوان: مساهمة التدفق الخلوي في تشخيص الهيموجلوبين ليلية الانتياي .

الكاتبة: نوال الوردغي .

الكلمات الأساسية: الهيمو غلوبينية الانتيايية الليلية ، cd55 ، cd59 فقر الدم اللاتنسجي، تدفق خلوي.

الهيمو غلوبينية الانتيايية الليلية (HPN) هو اضطراب نادر من نخاع العظام ناجم عن طفرة جسدية في PIG-A، جين مطلوب لتوليف الغليكوزيل فسفاتيديلا ينيوزيتول (GPI) المسؤول عن تثبيت عديد من جزيئات الغشاء. يتميز هذا المرض بنقص GPI مما يؤدي إلى عجز في الجزيئات المرتبطة عن طريقه ، من أبرزها CD55 CD59 وهي الأكثر أهمية. ومع ذلك، فقد تم مؤخرا اكتشاف الطفرات البديلة التي تتسبب في HPN.

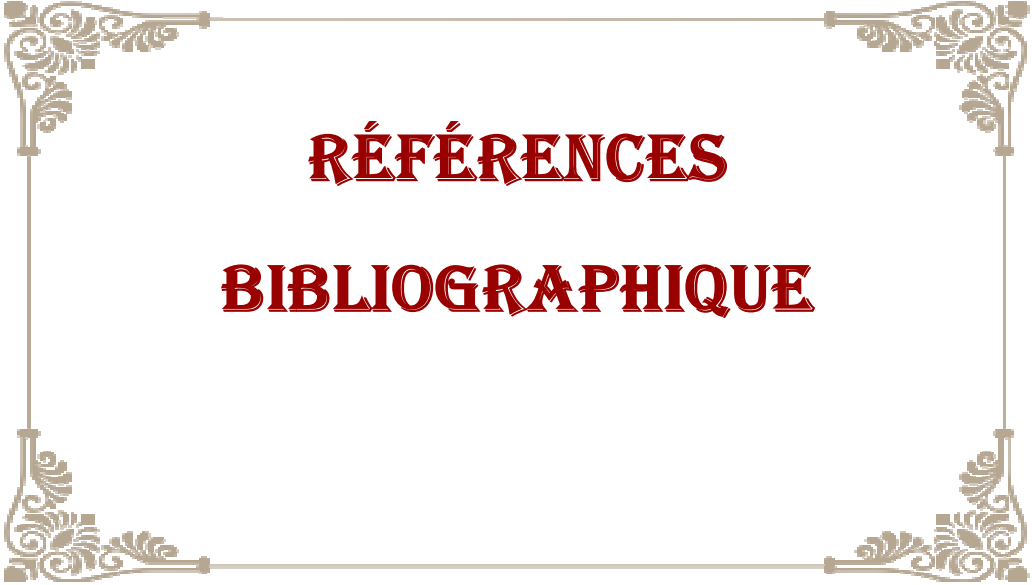
ويضم هذا العمل اخر المستجدات حول الفيزيولوجيا المرضية، التشخيص المختبري والعلاجات

الحالية ل HPN

ويتجلى HPN على المستوى السريري بانحلال الدم داخل الأوعية ونلاحظ أيضا في هذا المرض في كثير من الأحيان فشل النخاع العظمي وكذلك حلقات الانسداد التجلطي.

التدفق الخلوي هو الطريقة المرجعية لتشخيص ورصد HPN .

إيكوليزوماب، مضاد الأجسام ضد جزء C5 التكملة، هو العلاج الأمثل للمرضى الذين يظهرون مظاهر حادة. زرع نخاع العظام هو العلاج الوحيد لهذا المرض، ولكن يجب أن تكون محفوظة للمرضى ذوي استجابة الأقل لإيكوليزوماب.



RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

- [1] Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Luzzatto L. Mutations in the PIG-A gene causing partial deficiency of GPI-linked surface proteins (PNH II) in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 1994;87(4):863–866.
- [2] Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Miyata T, Yamada N, Takeda J, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J.* 1994;13(1):110–117.
- [3] Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ. Clinical Cytometry Society. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2010;78(4):211–230.
- [4] Correia RP, Bento LC, Bortolucci ACA, et al. Technical advances in flow cytometry-based diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Einstein.* 2016;14(3):366-373
- [5] 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(10):2669–2673.
- [6] Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, Austen KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(16):5066–5070.
- [7] Brodsky RA. Narrative review : paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the physiologie of complement-related hemolytic anemia. *Ann Intern Med.* 2008 ;148(8) :587-95.
- [8] Parker C, et al. Historical aspects of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: ‘defining the disease’. *Br J Haematol.* 2002 ;117(1) :3-22.
- [9] Delbrel X, Vialard JF, Chabrol J, Reiffers J, Longy-Boursier M, Mahon FX. Intérêt de la cytométrie en flux dans le diagnostic précoce de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *La revue de médecine interne.* 1998;19(3) :412.

- [10] Brodsky RA, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008 ;111(4) :1840-7.
- [11] Rother RP, et al. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol*. 2007 ;25(11) :1256-64.
- [12] Heilmeyer L, Strubing P. the discoverer of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (Strubing- Marchiafava anemia). *Dtsch Med Wochenschr*. 1950 ;84(8) :335-6
- [13] Miyata T, et al. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science*. 1993 ;259(5099) :1318-20
- [14] Takeda J, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*. 1993 ;73(4) :703-11
- [15] Terra R. La cytométrie en flux et le dépistage de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN): quoi de neuf ?. 2011.
- [16] Hill A, Platts PJ, Smith A, et al. The incidence and prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. *Haematologica*. 2007; 92[suppl.2]:25
- [17] Wendell F; Rosse .Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Orphanet Encyclopedia*. 2004.
- [18] Udenfriend S, Kodukula K. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:563-91
- [19] Kinoshita T, Inoue N. Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*. 2000;4:632-638.
- [20] Pu JJ, Brodsky RA. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria from Bench to Bedside. *Clinical and translational science*. 2011;4(3):219-224.

- [21] Miyata T, Takeda J, Iida Y, et al. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science*. 1993;259:1318–1320.
- [22] Takahashi M, Takeda J, Hirose S, et al. Deficient biosynthesis of N-Acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med*. 1993;177:517–521.
- [23] Watanabe R, Inoue N, Westfall B, et al. The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. *EMBO J*. 1998;17:877–885.
- [24] <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIGA> consulté le 24/1/2017
- [25] Luzzatto L, Bessler M. the dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol*. 1996;3:101-10
- [26] Peffault de Latour R, Amoura Z, Socié G. L'hémoglobinurie paroxystique nocturne Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *La Revue de médecine interne*. 2010;31(3):200–207
- [27] Krawitz PM, Hochsmann B, Murakami Y, Teubner B, Kruger U, Klopocki E, et al. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood*. 2013;122:1312–5
- [28] Dunn DE, et al. paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med*. 1999;131(6):401-8.
- [29] Mukhina GL, et al. Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient haematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br J Haematol*. 2001;115(2):476-82
- [30] Parker CJ. Hemolysis in PNH. In: Young NS, Moss J, eds. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and the Glycosylphosphatidylinositol-Linked Proteins*. San Diego, CA: Academic Press. 2000:49-100.
- [31] Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol*. 2006;176(3):1305-1310.

- [32] Nicholson-Weller A, Burge J, Fearon DT, Weller PF, Austen KF. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *J Immunol*. 1982;129(1):184-189.
- [33] Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 1989;84(1):7-17.
- [34] Holguin MH, Wilcox LA, Bernshaw NJ, Rosse WF, Parker CJ. Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 1989;84(5):1387-1394.
- [35] Morneau C. Hémoglobinurie paroxystique nocturne : défi diagnostique en médecine interne. *La Revue de médecine interne*. 2009;30(10):931-934
- [36] Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol*. 1989;26:201-7.
- [37] Ohashi H, Hotta T, Ichikawa A, Kinoshita T, Taguchi R, Kiguchi T, et al. Peripheral blood cells are predominantly chimeric of affected and normal cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: simultaneous investigation on clonality and expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Blood*. 1994;83:853-9.
- [38] Terstappen LW, Nguyen M, Huang S, Lazarus HM, Medof ME. Defective and normal haematopoietic stem cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 1993;84:504-14.
- [39] Terstappen LW, Nguyen M, Lazarus HM, Medof ME. Expression of the DAF (CD55) and CD59 antigens during normal hematopoietic cell differentiation. *J Leukoc Biol*. 1992;52:652-60.
- [40] Kawagoe K, Kitamura D, Okabe M, Taniuchi I, Ikawa M, Watanabe T, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996;87:3600-6.

- [41] Kawagoe K, Takeda J, Endo Y, Kinoshita T. Molecular cloning of murine pig-a, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function, and genetic locus. *Genomics*. 1994;23:566–74.
- [42] Iwamoto N, Kawaguchi T, Horikawa K, Nagakura S, Kagimoto T, Suda T, et al. Preferential hematopoiesis by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone engrafted in SCID mice. *Blood*. 1996;87:4944–8.
- [43] Dunn DE, Yu J, Nagarajan S, Devetten M, Weichold FF, Medof ME, et al. A knock-out model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pig-a(-) hematopoiesis is reconstituted following intercellular transfer of GPI-anchored proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:7938–43.
- [44] Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2015;373:35–47.
- [45] Shen W, Clemente MJ, Hosono N, Yoshida K, Przychodzen B, Yoshizato T, et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014;124:4529–38.
- [46] Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015;126:9–16.
- [47] Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371:2488–98.
- [48] Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371:2477–87.
- [49] Peffault de Latour R, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008;112(8):3099-106

- [50] Hillmen P, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 1995;333(19):1253-8
- [51] Socié G, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *French Society of Haematology. Lancet.* 1996;348(9027):573-7
- [52] Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2005; 106:3699-3709.
- [53] Loschi M, Latour RP, Socié G. L'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Hématologie.* 2013 ; 19 : 319-330
- [54] Rodrigues CA, Blin N, De Latour RP, Socié G. Hémoglobinurie paroxystique nocturne et thrombose. *Mini-revue. Sang Thrombose Vaisseaux.* 2007 ;19(8) : 425-9
- [55] Doutrelon C, et al. L'hémoglobinurie paroxystique nocturne : une cause méconnue de thrombose ? *J Mal Vasc.* 2015
- [56] Singer AL, Locke JE, Stewart ZA, et al: Successful liver transplantation for Budd-Chiari syndrome in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with the anti-complement antibody eculizumab. *Liver Transpl.* 2009;15:540.
- [57] Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2013;121:4985–96
- [58] Socié G, Sicre de Fontbrune F, Michonneau D, Peffault de Latour R. Hémoglobinurie paroxystique nocturne. 2016;11(4):1-8
- [59] Van Bijnen ST, Van Heerde WL, Muus P. Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J ThrombHaemost.* 2012 ; 10 (1) : 1-10.
- [60] Berthou C. *Conduite à tenir devant Une bi ou pancytopenie.* 2006
- [61] Nakao S, Sugimori C, Yamazaki H. Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure. *International J. of Hematology.* 2006;2(84):118-122.

- [62] Schrezenmeier H, Muss P, Socié G, Szer J, Urbano- Ispizua A, Maciejewski JP *et al.* Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica*.2014 ;99(5) : 922-7.
- [63] Maciejewski JP, Sloan EM, Sato T, Anderson S, Young NS. Impaired hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/aplastic anemia is not associated with a selective proliferative defect in the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient clone. *Blood*.1997 ;89(4) : 1173-81.
- [64] Pu JJ, Mukhina G, Wang H, Savage WJ, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *Eur J Haematol*. 2011 ;87(1) : 37-45.
- [65] Hill A, Richards SJ, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2007 ;137:181-92.
- [66] Genty V, Dine G. Surveillance et diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne en cytométrie de flux. *Bio trib*. 2008;27: 28.
- [67] Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao VS. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood*. 2002;100:3897-3902
- [68] Loschi M, Porcher R, Barraco F, Terriou L, Mohty M, de Guibert S, et al. Impact of eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a treatment versus no-treatment study. *Am J Hematol*. 2016;91:366–70.
- [69] Ham th. Hemoglobinuria. *Am J Med*, 1955 ;18(6) :990-1006
- [70] Hartmann RC, Jenkins DE. The sugar-water test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1966 ;275(3) :155-7
- [71] Rosse WF. Dr Ham's test revisited. *Blood*. 1991 ;78(3) :547-50
- [72] Janssens G. Répertoire d'analyse de biologie clinique.2009;14-15.

- [73] Besa EC, Krishnan K, et al. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Workup. 2011
- [74] Bessler M, Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;104-10
- [75] Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. *Hematology Am Hematol Educ Program*. 2008 ;93-106
- [76] Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996 ;87(12) :5332-40
- [77] Bressler M, Fehr J. Fc III receptors (FcRIII) on granulocytes : a specific and sensitive diagnostic test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Eur J Haematol*. 1991 ;47(3) :179-84
- [78] Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry*. 2000 ;42(4) :223-3
- [79] Richards SJ, et al. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;76(1) :47-55
- [80] Alfinito F, et al. Blood cell flow cytometry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : a tool for measuring the extent of the PNH clone. *Leukemia*. 1996 ;10(8) :1326-30
- [81] Kwong YL, et al. Flow cytometric measurement of glycosylphosphatidyl-inositol-linked surface proteins on blood cells of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Clin Pathol*. 1994 ;102(1) :30-5
- [82] Sutherland DR, et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007 ;72(3) :167-77
- [83] Hernandez-Campo PM, et al. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells : a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006 ;70(2) :71-81

- [84] Wang SA, et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica*. 2009 ;94(1) :29-37
- [85] Yamashina M, et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1990;323(17) :1184-9
- [86] <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/cellules-immunes-et-organes-lymphoïdes/la-cytométrie-en-flux>. consulté le 24/1/2017
- [87] Sahin F, Akay OM, Ayer M, et al. PNH diagnosis, follow-up and treatment guidelines. *American Journal of Blood Research*. 2016;6(2):19-27.
- [88] Emile C. Diagnostic et suivi biologique de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN). *Option Bio*. 2015 ;26 :526-527
- [89] laboratoire d'hématologie, unité de phénotypage par cytométrie en flux et d'amémie. Centre Hospitalier Ibn Sina Rabat.
- [90] Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. **2014** ; 124:2804-2811
- [91] Nelson KL, Raja SM, Buckley JT. The glycosylphosphatidylinositol-anchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem*. 1997 ;272(18) :781-8
- [92] Parker MW, Van Der Goot FG, Buckley JT. Aerolysin-the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol Microbiol*. 1996 ;19(2) :205-12
- [93] Brodsky RA, et al. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin. *Blood*. 1999 ;93(5) :1749-56
- [94] Brodsky RA, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol*. 2000 ;114(3) :459-66

- [95] Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, Scrobohaci ML, et al. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: search for a pathogenetic link. *Blood*. 1995;85:1354-1363.
- [96] Harada H, Mori H, Niikura H, Omine M. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in association with chronic myelofibrosis. In: Omine M, Kinoshita T, ed. *Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Related Disorders: Molecular Aspects of Pathogenesis*. 2003:251-254.
- [97] Meletis J, Terpos E, Samarkos M, et al. Red cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-phenotype in patients with acute leukemia. *Hematology*. 2002;7:69-74.
- [98] Prince GM, Nguyen M, Lazarus HM, Brodsky RA, Terstappen LW, Medof ME. Peripheral blood harvest of unaffected CD34+ CD38-hematopoietic precursors in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1995;86:3381-6.
- [99] Brodsky RA, Jones RJ. Aplastic anaemia. *Lancet*. 2005;365(9471):1647-56
- [100] Young NS. Acquired aplastic anemia. *Ann Intern Med*. 2002 ;136(7) :534-46
- [101] Antin JH, et al. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria :eradication of the PNH clone and documentation of complete lymphohematopoietic engraftment. *Blood*. 1985 ;66(6) :1247-50
- [102] brodsky RA, et al. Reduced intensity HLA-haploidentical BMT with post transplantation cyclophosphamide in nonmalignant hematologic diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2008 ;42(8) :523-7
- [103] cho SG, et al. Conditioning with high-dose cyclophosphamide may not be sufficient to provide a long-term remission of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria following syngeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001 ;28(10) :987-8
- [104] Suenaga K, et al. Successful application of nonmyeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *ExpHematol*. 2001 ;29(5) :639-42

- [105] brodskyRA.How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2009; 113(26) :6522-7
- [106] RosseWF.Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.*Blood*.1982 ;60(1) :20-3
- [107] bortolotti M, et al. Effects of sildenafil on esophageal motility of patients with idiopathic achalasia.*Gastroenterology*.2000 ; 118(2) :253-7
- [108] bortolotti M, et al. Effects of sildenafil on hypertensive lower oesophagealsphincter.*Eur J. clinInvest*.2002 ;32(9) :682-5
- [109] Ray JG, et al. paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the risk of venous thrombosis : review and recommendations for management of the pregnant and non pregnant patient. *Haemostasis*.2000 ;30(3) :103-17
- [110] Moyo VM, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using modern diagnostic assays.*Br J Haematol*.2004 ;126(1) :133-8
- [111] Socie G, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria :long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology.*Lancet*.1996 ;348(9027) :573-7
- [112] hillmen P, et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.*Blood*.2007 ;110(12) :4123-8
- [113] kuo GP, Brodsky RA, Kim HS.Cather-directed thrombolysis and thrombectomy for the budd-chiari syndrome in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in three patients.*JVascIntervRadiol*.2006 ;17(2 Pt 1) :383-7
- [114] Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*.2003 ;102: 3587-91.
- [115] Brodsky RA.Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.*BloodReviews*.2007 ;22 : 65–74
- [116] Hillmen P, et al. Effects of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2004 ;350(6) :552-9

- [117] Hillmen P, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 2006 ;355(12) :1233-43
- [118] Schubert J, et al. Eculizumab, a terminal complement inhibitor, improves anaemia in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *BrHaematol.* 2008 ;142(2) :263-72
- [119] Trinquand A. hémoglobinurie paroxystique nocturne : diagnostic et suivi par cytométrie en flux. [thèse de doctorat médecine, Biologie médicale-hématologie]. Paris 6 PIERRE ET MARIE CURIE. 2010
- [120] Parker C. Eculizumab for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet.* 2009 ;373(9665) :759-67
- [121] Tichelli A, Socie G, Marsh J, et al. Outcome of pregnancy and disease course among women with aplastic anemia treated with immunosuppression. *Ann Intern Med.* 2002 ;137: 164-172.
- [122] http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=447 consulté le 24/2/2017

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



- أن أراقب الله في مهنتي
 - أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيما لتعاليمهم.
 - أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
 - أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
 - أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
 - لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.
- والله على ما أقول شهيد

والله على ما أقول شهيد



مساهمة التدفق الخلوي في تشخيص الهيموجلوبين الانتيايية الليلية .

أطروحة:

قدمت ونوقشت علانية يوم.....

من طرفه

الآنسة : نوال الوردغي

المزداة في 25 غشت 1992 بسلا

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: الهيموغلوبينية الانتيايية الليلية، cd55، cd59 فقر الدم اللاتنسي، تدفق خلوي.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة:

رئيس

السيد: عز العرب مسرار

أستاذ في علم الدم البيولوجي

مشرفة

السيدة: سعاد بنكيران

أستاذة في علم الدم البيولوجي

السيدة: منى نزيه

أعضاء

أستاذة في علم الدم البيولوجي

السيد: عبد الله دامي

أستاذ في علم الكيمياء الحيوية