

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

ANNEE: 2018

THESE N°: 20

HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE
NOCTURNE INFRACLINIQUE :
APPORT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mr. Jaafar FOUIMTIZI
Né le 26 Janvier 1993 à Rabat

Pour l'Obtention du Doctorat en Médecine

MOTS CLES : Hémoglobinurie paroxystique nocturne – Gènes et protéines GPI – CD59 –
CD 55 – Cytométrie en flux.

JURY

Mr. A. DAMI

Professeur de Biochimie

PRESIDENT

Mr. A. MASRAR

Professeur d'Hématologie Biologique

RAPPORTEUR

Mr. M. NAZIH

Professeur d'Hématologie Biologique

JUGES

Mme. S. BENKIRANE

Professeur d'Hématologie Biologique



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية 31



بِسْمِ اللَّهِ
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



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 – <u>Clinique Royale</u>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID 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. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOU DA 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. BENSOU DA 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. BENJAUFAR Nouredine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques Doyen de la FMPA
Gynécologie Obstétrique



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

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 Lalla Ouafae
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

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

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
Pr. ZBIR EL Mehdi*

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

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

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

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



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

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

Novembre 1998

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

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

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.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

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



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
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie *Directeur Hop. Chekikh Zaied*
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anatomie Pathologique
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. SABBABH 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
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *

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

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*

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

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

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

Janvier 2005

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

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 Najja

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

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

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 Saïda*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

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

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie



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 Lhousain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ez zohra*
 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

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
 Pr TAHIRI My El Hassan*

Chirurgie générale
 Chirurgie cardio vasculaire
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Anesthésie réanimation ***Directeur ERSM***
 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

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale

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'KASSIMI Hachemi*
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*
Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*

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
Radiologie
Chirurgie pédiatrique
Pédiatrie
Radiologie

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

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

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*

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

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*
0.
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
Pr. EL GUERROUJ Hasnae
Pr. EL HARTI Jaouad

Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique

Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique



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*

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.

***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

***Enseignants Militaires**

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

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.



AOUT 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

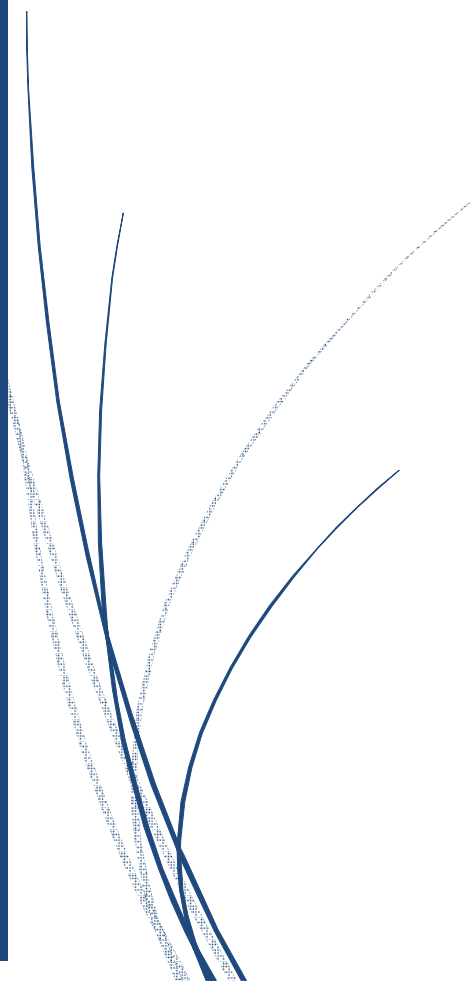
Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
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	Zootecnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	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*





DEDICACES



A la mémoire de ma grande mère

Lalla LATIFA

Aucun mot ne pourra exprimer ma grande tristesse en ton absence...

Ton visage gaie et souriant...

Ta tendresse infinie...

Et ton amour incomparable...

Resteront à jamais gravés dans mon cœur...

Je te remercie pour tous les beaux moments que nous avons partagé en famille...

Je te remercie pour m'avoir appris à être ce que je suis...

Je te remercie pour ton grand amour...

Tu me manques beaucoup grand mère...

J'aurai aimé que tu sois à mes côtés ce jour...

Mais le destin en a décidé autrement...

J'espère que tu es fier de moi...

Je t'aime...

Que ton âme repose en paix...

A ma chère mère JAMAI Rajae

A ma très chère mère, merci pour votre amour, pour tout l'enseignement que vous m'avez transmis, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir toujours soutenue, pour vos sacrifices, vos prières et pour l'encouragement sans limites que vous ne cessez de m'offrir...

Merci pour vous être sacrifiée pour que je grandisse et prospère, merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la vie, au bien être de votre enfant, merci pour vos prières, votre soutien dans les moments difficiles, pour votre courage et patience...

Aucun mot ne se pourra exprimer mon amour pour vous et mon immense reconnaissance.

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mes sentiments les plus forts, mon profond respect et ma plus grande gratitude.

Que Dieu vous bénisse et vous prête bonne santé et longue vie.

A ma chère tante JAMAI Ouafae

Pour l'affection, la tendresse et l'amour

dont tu m'a toujours entouré,

Pour le sacrifice et le dévouement dont tu as toujours fait preuve,

Pour l'encouragement sans limites que tu ne cesses de manifester.

*Aucun mot, aucune phrase ne peut exprimer mes sentiments profonds d'amour,
de respect et de reconnaissance.*

Que ce modeste travail soit un début de mes récompenses envers toi.

Puisse le grand puissant te donner

bonne santé et longue vie...

A mon chère oncle JAMAI Hamid

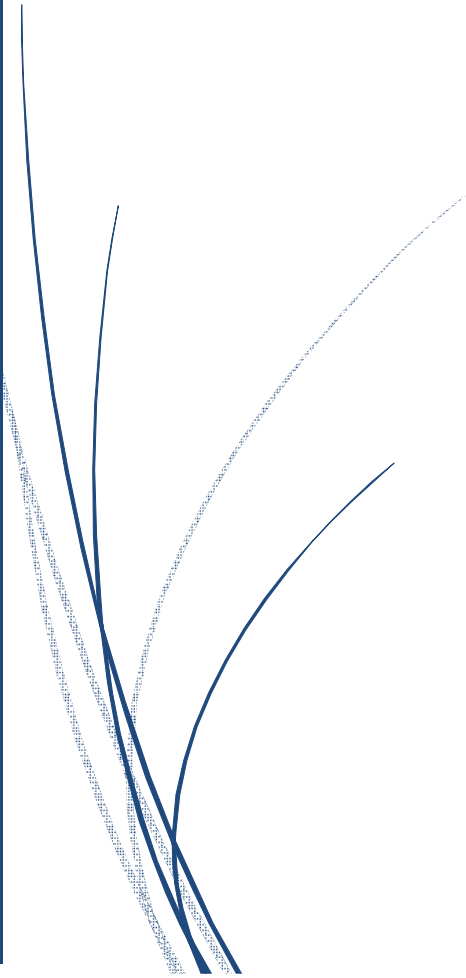
*Vous êtes pour moi mon deuxième père, je ne peux exprimer avec des mots tout
l'amour et l'affection que j'ai pour vous.*

*J'ai beaucoup de chance de vous avoir à mes côtés, et je vous souhaite beaucoup
de bonheur et de réussite.*

*Veillez retrouver en ce travail l'expression de mon amour, ma gratitude et mon
grand attachement.*



REMERCIEMENTS



A notre maître et Président de thèse

MR DAMI ABDALLAH

Professeur de Biochimie

*Nous vous remercions pour le grand honneur que vous nous faites en acceptant
de présider cette thèse.*

*Votre compétence, votre dynamisme, ainsi que vos qualités humaines et
professionnelles exemplaires ont toujours suscité notre admiration.*

*Qu'il soit permis, cher maître, de vous exprimer notre sincère reconnaissance,
notre profond respect et notre plus grande estime.*

A notre maître et rapporteur de thèse

Mr MASRAR AZLARAB

Professeur d'Hématologie biologique

Vous nous avez inspiré le sujet de thèse, vous nous avez guidé tout au long de son élaboration, avec bienveillance et compréhension, flexibilité et disponibilité ont été les qualités les plus marquantes au cours de cette collaboration. Votre accueil si simple, pour l'un de vos élèves, vos qualités humaines rares, vos qualités professionnelles ont été un enseignant complémentaire pour notre vie professionnelle et privée.

Veillez accepter ici, cher maître, l'expression de notre gratitude et l'expression de notre profonde reconnaissance

A notre maître et juge de thèse

Mme. NAZIH MONA

Professeur d'Hématologie biologique

C'est pour nous un immense plaisir de vous voir siéger parmi le jury de notre thèse. Nous avons toujours été impressionné par vos qualités humaines et professionnelles.

Veillez agréer, cher maître, nos dévouements et notre éternelle reconnaissance.

A notre maître et juge de thèse
Mme BENKIRANE SOUAD
Professeur d'Hématologie biologique

*Permettez nous de vous remercier pour avoir si gentiment accepté de faire partie
de nos juges.*

*En dehors de vos connaissances claires et précises, dont nous avons bénéficié, vos
remarquables qualités humaines et professionnelles méritent toute admiration et
tout respect.*

*Veillez trouver ici le témoignage respectueux de notre reconnaissance et
admiration.*

Abréviations

Ac	: Anticorps
Ac Mo	: Anticorps monoclonal
AG	: Antigène
AM	: Aplasie médullaire
AVK	: Antivitamines K
CAM	: Complexe d'attaque membranaire
CD	: Cluster of differentiation
CFU	: Colony forming units
CMF	: Cytométrie en flux
CSH	: Cellule souche hématopoïétique
CSH	: Cellule souche hématopoïétique
DAF	: Decay accelerating factor
Dol-P-Man (DPM)	: Dolichol-phosphate-mannose
EtNP	: Ethanolamine phosphate
GlcN	: Glucosamine
GlcNAc	: Glucosamine N-acétyl
GlcNac-PI	: N-acétylglucosaminylphosphatidylinositol
GPI	: Glycosyl phosphatidyl inositol
GPI-AP	: Protéines GPI ancrées

GPI-MT I	: α 1-4 GPI mannosyltransferase I
GPI-MT II	: α 1-6 mannosyltransferase II
GPI-TA	: GPI Transamidase
Hb	: Hémoglobine
HPN	: Hémoglobinurie paroxystique nocturne
IRM	: Imagerie par résonance magnétique
LMA	: Leucémie myéloïde aigue
Man	: Mannose
MIRL	: Membrane inhibitor of reactive lysis
PAL	: Phosphatase alcaline
PE	: Phosphatidyl éthanolamine
PI	: Phosphatidyl inositol
PIG-A	: Phosphatidyl inositol glycan class A
PIPLC	: Phosphatidyl inositol phospholipase C
RE	: Réticulum endoplasmique
SBC	: Syndrome de Budd-Chiari
SFH	: Société Française d'Hématologie
SMD	: Syndromes myélodysplasiques



SOMMAIRE



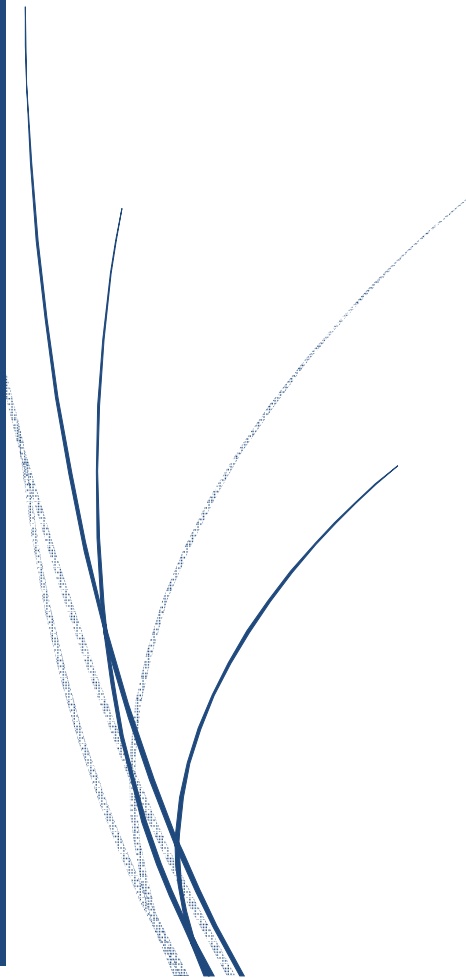
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	4
EPIDEMIOLOGIE	7
1- Incidence.....	8
2- Circonstances de survenue	9
PREMIERE PARTIE : LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HPN	10
1-Système du complément	11
2-Les cellules sanguines et leur mécanisme de défense contre l'effet du Complément activé	17
3-Aspects biochimiques et moléculaires de l'HPN.....	19
4-Le clonage du gène PIG-A.....	23
DEUXIEME PARTIE : DIAGNOSTIC DE L'HPN	30
I-Description clinique de l'HPN.....	31
1-Symptomatologie	31
2-L'examen clinique	34
II-Diagnostic biologique de l'HPN.....	36
1-Les tests biologiques	36
2-Les méthodes de diagnostic biologique	39
3-Les tests immunocytologiques en cytométrie de flux	43
III- Imagerie.....	53

1-Echographie Doppler	53
2-Scanner ou Tomodensitométrie (TDM)	53
3- Imagerie par résonance magnétique (IRM)	54
IV- Diagnostic différentiel	54
V- Diagnostic évolutif.....	55
1- Evolution et Pronostic.....	55
2-Hémopathies associées	56
3- Complications	57
TROISIEME PARTIE : ATTITUDE THERAPEUTIQUE DE L'HPN.....	62
1-Traitements spécifiques.....	63
1.1-Eculizumab	63
1.2-Les immunosuppresseurs	66
1.3-Les Androgènes	67
1.4-Les Corticostéroïdes	68
1.5-La Greffe de Moelle dans l'HPN	68
2-Traitements symptomatiques et préventifs	69
2.1-Les Anticoagulants	69
2.2-Les Transfusions	70
2.3-Le Traitement Martial	70
2.4-L'acide folique	70
2.5-L'EPO	71

2.6-Les antalgiques et antispasmodiques	71
3-Mesures Préventives	71
4-Indications	71
CONCLUSION	74
RESUMES	76
REFERENCES	80



INTRODUCTION



L'Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), ou maladie de Marchiafava-Micheli, est une maladie rare et acquise des cellules souches hématopoïétiques, définie par la lyse de la membrane des globules rouges par le système du complément, suite à la mutation du gène PIG-A responsable de la codification des protéines membranaires, essentielles à la protection des cellules sanguines contre l'activité lytique du complément. Il s'agit alors d'une maladie clonale responsable d'anomalies de la synthèse de protéines membranaires qui sont à l'origine de l'ancrage glycophospholipidique dans les cellules sanguines en particulier les protéines régulatrices du complément, ce qui engendre une sensibilité anormale du globule rouge à l'égard de l'activité du complément d'attaque membranaire.

Cette mutation est non seulement responsable de l'anémie hémolytique intravasculaire acquise, corpusculaire et récurrente à Coombs négatif qui caractérise l'HPN [1], mais également d'une granulocytopénie et/ou d'une thrombopénie par l'intermédiaire du même mécanisme, exposant ainsi le patient aux différentes complications infectieuses et thrombotiques.

Sur le plan pratique, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne est révélée classiquement devant une maladie hémolytique et thrombosante, ou moins fréquemment devant une aplasie médullaire. A noter également qu'un chevauchement entre les 2 tableaux cliniques n'est pas exceptionnel.

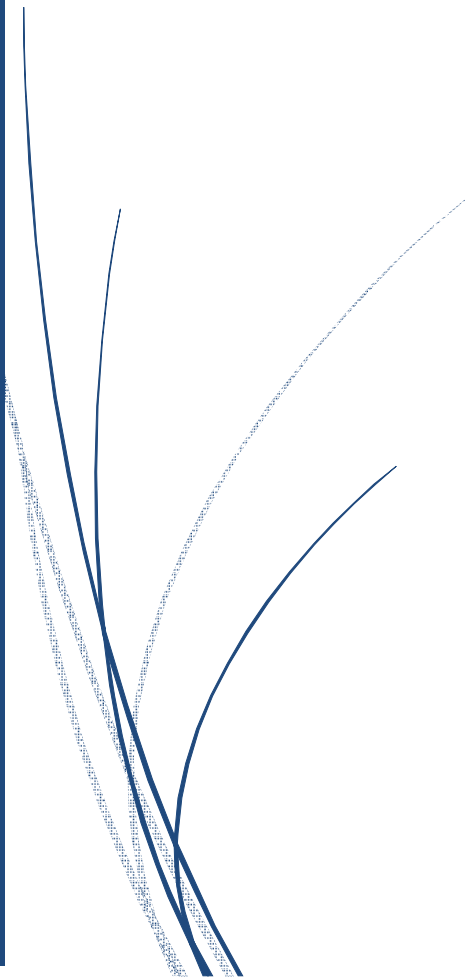
L'HPN se caractérise par une évolution progressive et chronique, pouvant mettre en jeu, à long terme, le pronostic vital. Mais l'utilisation plus répandue de la cytométrie en flux qui met en évidence le déficit du système d'ancrage des protéines membranaires à la surface cellulaire, permettant ainsi le diagnostic de la maladie, a eu un impact important sur l'amélioration de la qualité de vie des

patients, ainsi que leur espérance de vie qui avoisine actuellement celle des personnes saines.

En se référant à 2 observations cliniques de patients atteints d'HPN recueilli au service d'hématologie biologique à l'hôpital Avicenne de Rabat, nous détaillerons les aspects physiopathologiques, les méthodes diagnostics ainsi que les attitudes thérapeutiques de cette pathologie.



HISTORIQUE



L'hémoglobinurie paroxystique nocturne est une maladie dont la première description remonte à la fin du XIX siècle : C'est Gull en 1866 [2] qui décrit cette maladie devant un tableau associant asthénie et urines rouges occasionnelles, puis Strübing, en 1882 [3], a pu identifier le pigment rouge éliminé dans les urines comme étant de l'hémoglobine provenant de l'hémolyse intravasculaire, ainsi que de différencier l'HPN de l'hémoglobinurie à frigore (communément retrouvé en cas de syphilis à cette époque), qui est-elle due à la destruction des globules rouges par l'anticorps de Donath-Landsteiner actif en basse température.

En 1911, Hijman Van der berg [4] découvre que le système du complément est le responsable de la lyse des globules rouges dans l'HPN

Au cours de la même année, Marchiafava et Nazani [5], suivis de Micheli en 1931 [6], établissent le tableau clinique classique de la maladie qui portera leur noms (Maladie de Marchiafava-Micheli).

En 1939, Ham démontre que le phénomène hémolytique est dû à l'activation du complément, et donnera par la suite son nom au test diagnostique de cette maladie [8], qui consistera en l'étude de l'hémolyse in vitro en milieu acidifié à $\text{pH}=6.5$ (qui active la voie alterne du complément).

En 1966, Hartmann et Jenkins [7] décrivent le test au sucrose. Les globules rouges de patients malades étaient mis en sérum contenant du saccharose afin d'observer l'hémolyse d'une partie de ces hématies.

En 1976 et 1977, Ikezawa [10] puis Low [9] ont constaté que les phosphatases alcalines libérées au cours de l'HPN sont accompagnées d'une phosphatidyl-inositol-phospholipase-C spécifique (PIPLC), ce qui a conduit à la

découverte d'une nouvelle famille de protéines membranaires désignés par protéines GPI ancrées (GPI-AP).

En 1982, Nicholson-Weller [11] isolent le CD55 ou DAF (decay accelerating factor) à partir de la membrane érythrocytaire, qui inhibe la voie du complément au niveau de la C3 convertase. Après l'avoir analysé, Weller constate que le CD55 isolé est déficient dans les cellules de sang prélevées sur des patients atteints de l'HPN [12], ce qui a expliqué la faiblesse des érythrocytes HPN contre le complément d'attaque membranaire.

En 1986, Davitz [13] et Medof [14] découvrent que le CD55 est une des protéines GPI ancrées, ce qui a permis de lever le voile sur la relation entre la sensibilité des érythrocytes envers le système du complément et le déficit en protéines GPI.

Depuis lors, l'HPN est considérée comme une maladie de la cellule souche hématopoïétique de nature clonale, due à une incapacité de synthèse de l'ancrage GPI.

En 1987, Parker découvre que les cellules de sang HPN sont déficients en CD59, qui est également une protéine GPI-A.

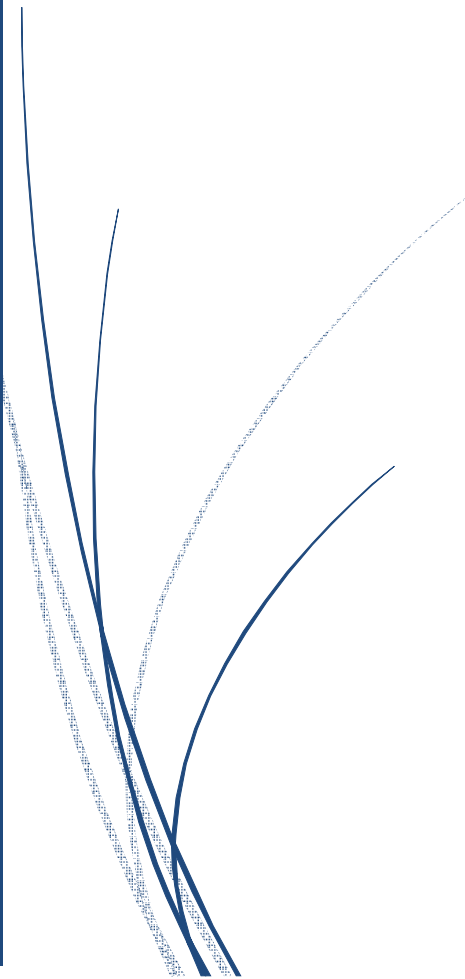
Depuis 1980, les progrès de la cytométrie en flux, puis après de la biologie moléculaire, ont permis une connaissance plus approfondie de cette maladie qui reste, malgré sa complexité, rare [31].

EN 1993, Kinoshita a démontré que l'HPN était liée à des anomalies d'un gène nommé PIG-A situé sur le chromosome X. Ce sont des mutations des cellules souche hématopoïétiques pluripotentes.

En 2007, approbation par la FDA et la commission européenne de l'éculizumab [19].



EPIDEMIOLOGIE



1-Incidence

L'HPN est une maladie rare qui touche environ 8.000 à 10.000 personnes en Amérique du Nord et en Europe [26]. En France, on a recensé 454 cas entre 1950 et 2005, avec une moyenne de 8 cas par an [41]. Cette pathologie a une incidence de 2 à 6 par million, à peu près semblable à celle de l'anémie aplasique avec laquelle elle partage une relation étroite. L'HPN est souvent méconnue, avec des retards dans le diagnostic allant d'une année à plus d'une décennie.

Elle frappe souvent les gens dans la fleur de l'âge, avec un âge moyen d'apparition dans le début des années 30, et les formes à révélation pédiatrique sont rares [34]. Elle touche l'homme comme la femme avec un sexe ratio H/F de 0,83. Il n'existe pas non plus de préjugé racial même si on note une légère augmentation de sa fréquence dans les pays asiatiques [15].

La thrombose est la principale cause de mortalité : 40 à 67 % des décès sont dus aux complications thrombotiques de la maladie [18]. Les sites de prédilection des thromboses sont des sites veineux : les veines sus-hépatiques (syndrome de Budd-Chiari), les veines cérébrales, les veines mésentériques et les veines rénales.

2-Circonstances de survenue

Certains facteurs étiologiques ont pu être incriminés, comme l'exposition à des produits toxiques pour les cellules médullaires: dérivés organiques (benzène, trichloréthylène, hydrocarbures), insecticides utilisés dans l'agriculture, médicaments (chloramphénicol, noramidopyrine, neuroleptique)...

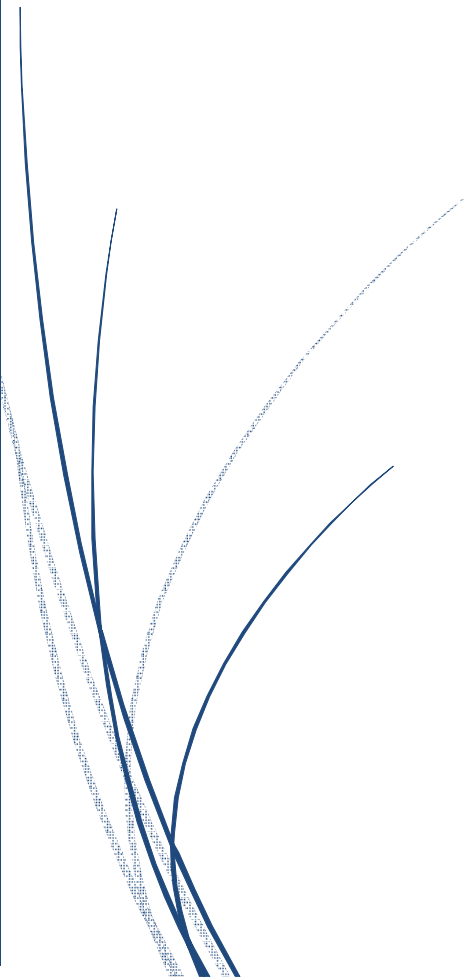
Cependant dans la plupart des cas la survenue de l'HPN ne peut être reliée à aucune cause [39].

En revanche, le déclenchement d'épisodes hémoglobinuriques au cours de l'évolution de la maladie peut être dû à une situation de stress (effort physique, intervention chirurgicale), à une stimulation du système immunitaire (injection, vaccination, transfusion), ou à la prise de médicaments (sulfamides, aspirine, pénicilline) [23].

La variété pancytopénique de l'HPN, par aplasie ou dysplasie myéloïde peut succéder à l'action d'un produit chimique : médicament, ou un produit utilisé dans l'industrie ou dans l'agriculture, comme dans les aplasies médullaires [27].



*PREMIERE PARTIE : LA
PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HPN*



1-Système du complément

Le système du Complément est un des mécanismes de défense contre les infections des plus anciens dans l'évolution. Il intervient non seulement dans la destruction des agents infectieux et dans l'élimination des complexes immuns, mais aussi dans le contrôle des réponses inflammatoires et la modulation des réponses immunes spécifiques.

C'est un ensemble de protéines à synthèse hépatique sous forme circulante dans le plasma et sous forme de récepteurs membranaires présents à la surface de nombreux types cellulaires [16]. Ce système fait partie de l'Immunité innée impliquant une activation, sans reconnaissance spécifique d'une cible, qui repose sur des liaisons physico-chimiques.

La voie classique, alterne et celles des lectines, sont les trois voies pouvant être activées par des composants chimiques qui leur sont spécifiques. Leur mise en œuvre entraîne des cascades d'activation par protéolyse successive de protéines plasmatiques. Ces trois voies d'activation convergent vers la protéine centrale du système du Complément, appelée C3.

Cette protéine est la cible des complexes enzymatiques issus des voies d'activation qui la clivent, ce qui entraîne la production d'un fragment appelé C3b. Ce dernier peut alors initier différentes voies effectrices à l'origine de la diversité des fonctions du Complément.

L'ensemble du système est étroitement régulé par un réseau de protéines plasmatiques et membranaires intervenant à différents niveaux.

Les mécanismes sous-jacents aux trois principales fonctions du système du complément sont expliqués :

- la lutte contre les infections à l'aide de trois « outils » : l'opsonisation, le recrutement des cellules inflammatoires et la destruction directe de l'agent infectieux par lyse osmotique
- l'élimination des complexes immuns circulants et des cellules apoptotiques
- la modulation des réponses immunes spécifiques

1.1- Les voies d'activations du complément

La voie classique :

L'activation par la voie classique est initiée par la fixation de la première protéine du Complément, C1q, à un de ses ligands. Parmi ceux-ci, les plus importants sont les domaines CH2 du fragment Fc des immunoglobulines IgG1, IgG2, et IgG3 et le domaine CH4 des IgM. Cette activation fait intervenir un complexe macromoléculaire composé de trois protéines : la protéine de reconnaissance, C1q, qui est associée à deux serines estérases C1r et C1s. Cette fixation entraîne l'auto-activation de C1r, qui clive et active ainsi C1s. Le composant C1s activé clive alors le composant C4 présent dans le plasma en un petit fragment C4a, 3 libéré en phase fluide, et un fragment majeur C4b, qui se fixe alors de façon covalente à la surface-cible de l'activation.

Le composant C2, circulant dans le plasma, peut alors s'associer au C4b et être clivé à son tour par C1s en un fragment C2a, qui reste associé à C4b, et un fragment C2b libéré en phase fluide.

Ainsi se trouve formé sur la surface activatrice le complexe C4b2a, appelé C3 convertase classique car il a la capacité de cliver C3. L'activité enzymatique est portée par la sous-unité C2a.

La voie des lectines :

La voie des lectines est activée par les structures carbohydrates des micro-organismes. Il existe une similitude avec la voie classique. La protéine de reconnaissance est ici la protéine MBL (Mannan Binding Lectin) et est associée à des sérines estérases appelées MASP 1, 2 et 3 (Mannan-Associated Serine Protease) qui présentent une forte homologie avec C1s et C1r.

Une fois activées, les MASP acquièrent la capacité de cliver les protéines C4 et C2 et participent à la formation d'une C3 convertase, C4b2a, identique à celle formée à l'issue d'une activation par la voie classique.

La voie alterne :

La voie alterne est activée par des substances d'origine bactérienne telles que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives, par des bactéries Gram positives, des virus ou des cellules infectées ou transformées. Les interactions des protéines de la voie alterne aboutissent à la formation de la C3 convertase alterne. L'assemblage de la C3 convertase alterne commence avec l'association d'une molécule de C3b avec le Facteur B. Cette association permet au facteur B d'être clivé par une sérine protéase circulant sous forme active dans le plasma, le Facteur D, produisant les fragments Ba et Bb. Le fragment Ba s'exclut du complexe tandis que le fragment Bb reste associé à C3b et acquiert une activité enzymatique. Le complexe C3bBb est la C3 convertase de la voie alterne capable de catalyser le clivage de C3 en C3b de façon absolument

identique au clivage réalisé par le complexe C4b2a. La C3 convertase alterne est un complexe enzymatique très labile qui peut être stabilisé en s'associant avec la Properdine. Le premier dépôt covalent de C3b se fait de façon aléatoire mais cette voie d'activation est capable d'une auto-amplification qui est très importante pour la reconnaissance et l'élimination des pathogènes en l'absence d'anticorps spécifiques.

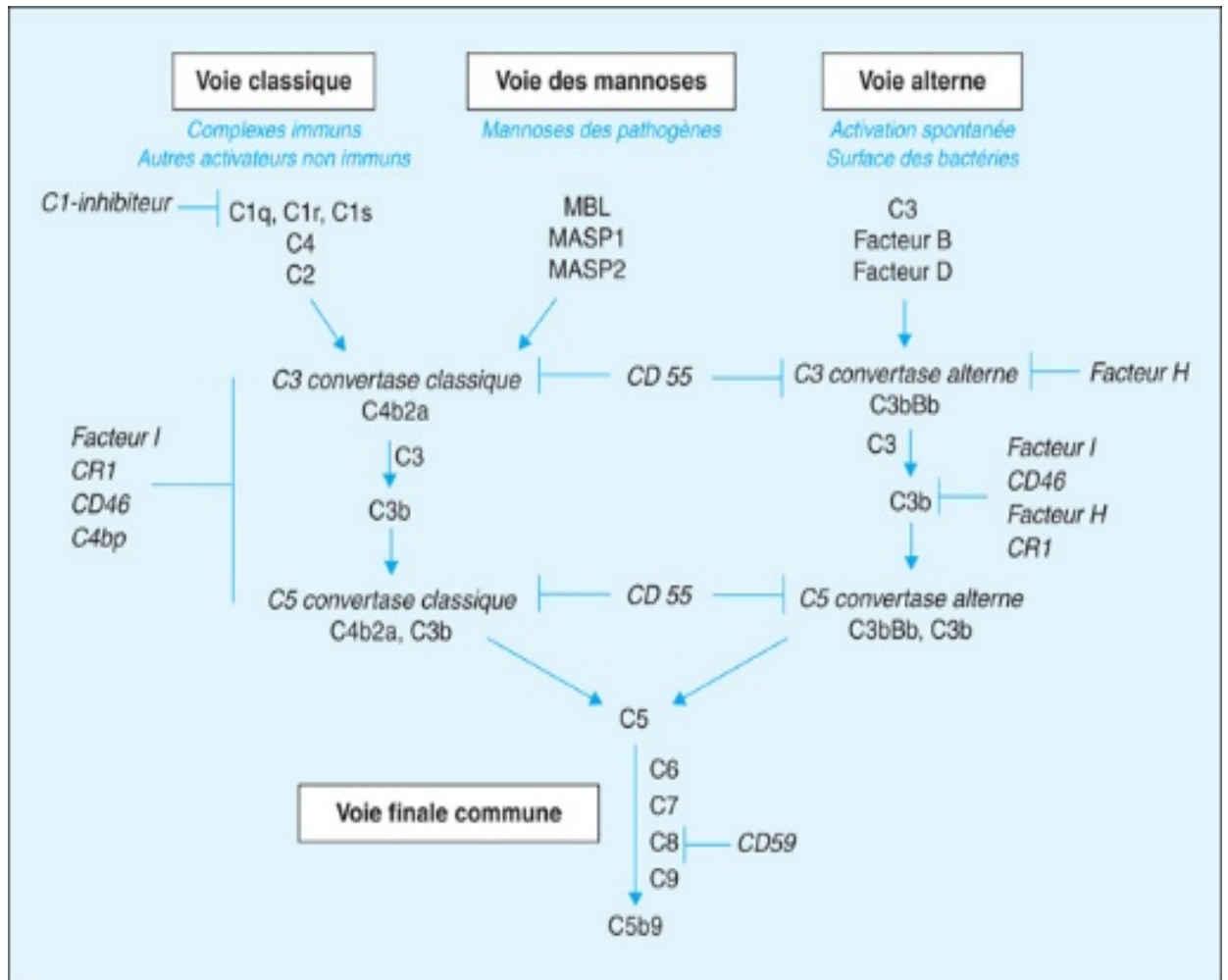


Figure 1 : Les voies d'activation du complément

1.2- Les voies effectrices du système du complément

A l'issue des 3 voies d'activation, deux C3 convertases (C4b2a, la C3 convertase classique et C3bBb, la C3 convertase alterne) peuvent être formées. Ces deux complexes moléculaires ont une même activité enzymatique qui assure le clivage de la protéine C3 en C3a et C3b. C3a est une petite molécule libérée en phase fluide, possédant des activités biologiques importantes dans la réaction inflammatoire, qui fait partie des anaphylatoxines. Par ailleurs, C3b se fixe de façon covalente sur un résidu thioester de la surface activatrice à proximité de la C3 convertase, et son devenir est multiple, déterminant les différentes voies effectrices du système du Complément.

La voie d'amplification :

Une molécule C3b nouvellement formée peut s'associer avec une nouvelle molécule de facteur B pour former une nouvelle C3 convertase alterne qui clive de nouvelles molécules de C3 et ainsi participe à la boucle amplificatrice de la voie alterne. La voie alterne peut également amplifier l'activation du Complément initiée par les deux autres voies, classique et des lectines. Ceci permet l'opsonisation de la surface activatrice (une bactérie par exemple), c'est à dire son recouvrement rapide par des molécules de C3b. Cette double fonction – reconnaissance et amplification- de la voie alterne souligne l'importance de son rôle dans la défense de l'hôte contre les pathogènes.

La voie finale commune :

L'association des C3 convertases avec des molécules supplémentaires de C3b peut changer leur affinité pour leur substrat et leur conférer une activité dite « C5 convertase ». En effet, la protéine C5 peut alors se lier aux complexes

(C4b2a)C3b ou (C3bBb)C3b et être soumise à leur activité enzymatique. La protéolyse de C5 (par les sous-unités C2a ou Bb des complexes) détache un petit peptide, le C5a, qui est une autre anaphylatoxine libérée en phase fluide. Le fragment restant est la molécule C5b. C5b peut s'associer aux composants C6, C7, C8 et C9 pour former le complexe d'attaque membranaire. C5b s'associe d'abord à C6, puis le complexe peut s'associer à C7 puis à C8 qui commencera un ancrage dans la membrane plasmique de la cellule cible. Le complexe (dit « sublytique ») C5b8 s'associe alors à plusieurs molécules de C9 qui en se polymérisant créent un véritable pore transmembranaire. Ainsi le complexe d'attaque membranaire (appelé mC5b9) permet une lyse osmotique de la cible (microorganisme, cellule transformée).

1.3- La régulation

Comme pour toute cascade d'activation, un réseau étroit de protéines circulantes ou membranaires est en place afin de réguler au plus près les différentes voies d'activation. La voie classique est régulée par deux protéines circulantes spécifiques, le C1-Inhibiteur qui interagit avec le complexe C1 et empêche son auto-activation, et la C4 binding protein (C4bp), qui, en se liant à C4b favorise sa dégradation en C4d par le Facteur I. La régulation, au niveau de l'initiation et de la dissociation de la C3 convertase alterne, est assurée par le Facteur H qui joue un rôle central pour discriminer les surfaces du soi et du non-soi. Il peut reconnaître les surfaces non-activatrices riches en polyanions comme l'acide sialique, l'héparane sulfate ou d'autres glycosaminoglycans. Il contrôle l'initiation de la C3 convertase alterne en entrant en compétition avec le Facteur B pour la fixation de C3b. Le facteur H accélère également la dissociation de la C3 convertase alterne en déplaçant le fragment Bb de la C3

convertase active. Le Facteur I et ses cofacteurs pour la dégradation de C3b (facteur H, CR1 et MCP) sont également considérés comme des régulateurs de la voie alterne. Il est à noter que CR1 et MCP peuvent également servir de cofacteurs au facteur I pour la dégradation de C4b. La protéine membranaire DAF (Decay Accelerating Factor ou CD55) est un régulateur négatif des C3 et C5 convertases, classique ou alterne, qui accélère leur dissociation. Enfin, le complexe d'attaque membranaire est sous le contrôle de deux protéines, une plasmatique, la protéine S, et une membranaire, CD59, qui empêchent la formation sur les membranes, respectivement, des complexes C5b-7 et C5b-8, et la polymérisation de C9 [16].

2-Les cellules sanguines et leur mécanisme de défense contre l'effet du Complément activé

A l'état normal le complément activé n'influence pas les cellules, par contre il va lyser les cellules cibles (HPN).

Plusieurs dispositifs permettent de protéger les cellules saines auto logues contre une activation du système du Complément à leur surface. Il existe des facteurs inhibiteurs destinés spécifiquement au contrôle et à la désactivation du Complément, et qui interviennent à trois niveaux de la cascade [20] :

- . L'inhibiteur de la fraction 1 du Complément C1
- . Les protéines de surfaces dont le DAF (Decay Accelerating Factor) ou l'antigène CD55 qui ont une action directe dans l'inhibition de la C3 convertase

- . Les molécules qui interviennent directement dans l'inhibition de la formation du MAC : MIRL (Membrane Inhibitor of Reactive Lysis) ; l'antigène CD59 ou HRF20 (Homologue Restriction Factor)

Le DAF est une glycoprotéine mono caténaire distribuée à la surface de plusieurs cellules (érythrocytes, leucocytes, cellules épithéliales et endothéliales) [17,21]. Il accélère la dissociation spontanée du C4 b2a et son déficit interviendrait dans la pathogénie de l'HPN rendant ainsi les hématies anormalement sensibles à la lyse par le complément. Ceci s'expliquerait par la conjonction de 2 anomalies biologiques :

- . Un déficit en DAF responsable d'une augmentation de la demi-vie des C3 convertases principalement alternes, sur la surface du GR avec, pour conséquence, un dépôt accru de C3b et un enclenchement de la boucle d'amplification.
- . Une sensibilité accrue à la lyse par le MAC lié à un déficit en HRF ou MIRL ou CD59.

Le MIRL ou CD59 a une certaine spécificité d'espèce, et protège la cellule contre la lyse par le complexe d'attaque de la membrane par le complément. En se liant à C8 (fraction 8 du complément), elle entrave le déploiement de C9 requis pour l'insertion de ce complexe d'attaque dans la membrane. Le CD59 inhibe également la fixation et la polymérisation ultérieures de C9 nécessaires pour l'assemblage de la molécule conduisant à la formation des pores.

Ces différentes molécules déficitaires dans l'HPN présentent toutefois un élément structural commun : leur attache à la membrane cellulaire par un ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) [30,25].

3-Aspects biochimiques et moléculaires de l'HPN

3.1-Structure du Système d'ancrage 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) [22].

Le système GPI n'est pas une structure transmembranaire. Cette structure extrêmement bien conservée dans le règne animal consiste en un phosphatidylinositol (PI) dont les acides gras pénètrent dans le feuillet lipidique externe de la membrane.

La partie inositol est liée à une molécule de glucosamine (GlcN), puis à trois molécules de mannose dont le troisième porte un éthanol-amine-phosphate. Le groupement amine primaire de l'éthanol-amine est engagé dans une liaison peptidique avec la partie C-terminale de la protéine ancrée [40].

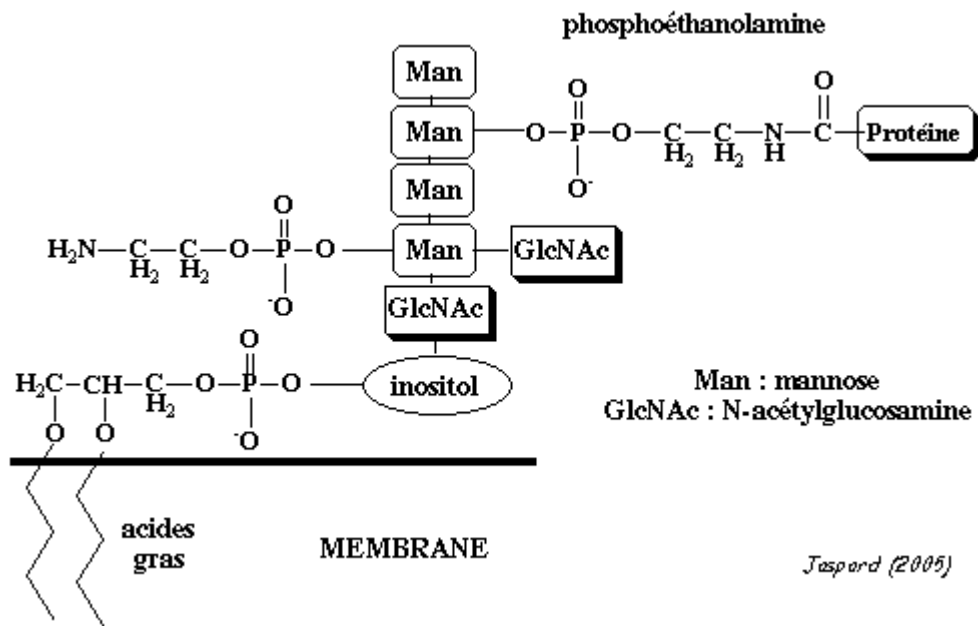


Figure 2 : Structure du système d'ancrage GPI

3.2-Biosynthèse de l'ancre GPI chez les mammifères

Les précurseurs de l'ancre GPI sont synthétisés et assemblés dans le réticulum endoplasmique (RE) à partir du phosphatidyl-inositol à travers au moins neuf étapes d'une séquence de réactions.

Étape 1 : La voie de la biosynthèse commence dans le côté cytoplasmique de la membrane du RE par le transfert du glucosamine N-acétyl (GlcNAc) au groupe hydroxyle en C-6 du phosphatidyl-inositol par l'UDP-GlcNAc (donneur de substrat), générant le glucosamine N-acétylphosphatidyl-inositol (GlcNAc-PI) [24]. La production de GlcNAcPI, est médiée par le GPI-GlcNAc transférase (GPI-GnT) qui est un complexe glycosyltransférase, composé de six principales sous unités (PIG-A, PIG-C, PIG-H, PIGP, PIG-Q et le PIG-Y) [33], avec une sous unité supplémentaire DPM2 qui améliore l'activité de GPI-GnT au triple

[28], PIG-A, PIG-C, PIG-H, PIG-P, PIG-Q et le PIG-Y sont toutes essentielles pour l'activité du complexe glycosyltransférase. PIGA est la sous unité catalytique [37].

Etape 2 : GlcNAc-PI est décarboxylé pour générer GlcN-PI du côté cytoplasmique, la désacétylation est médiée par PIG-L une protéine membranaire du RE [47].

Etape 3 : une chaîne acyl (généralement palmitoyl) est ajoutée au groupe hydroxyle en C-2 de l'inositol par l'acyl-CoA pour former GlcN-(acyl)-PI, parce que cette fixation est nécessaire pour l'ajout des résidus mannose. Le transfert de la chaîne acyl à l'inositol, est médié par la protéine multi-transmembranaire PIG-W ayant une activité acyl-transférase [47].

Etape 4 : GlcN-(acyl)-PI est retournée à travers la membrane du RE dans le côté lumenale. Il y a encore un argument à savoir si GlcN-(acyl)-PI ou GlcN-PI qui est retournée dans le côté lumenale [32,42]. Une enzyme flipase putative qui sert d'intermédiaire, pivotant le GlcN-PI dans le côté lumenale, n'a pas été identifiée [24].

Etape 5 et 6 : Man-1 et Man-2 sont successivement transférés à GlcN-(acyl)-PI à partir dolichol-phosphate-mannose (Dol-P-Man ou DPM : donneur de mannose) pour générer Man-Man-GlcN-(acyl)-PI [61].

Etape 5 : le transfert du premier mannose Man-1 est médié par l' α 1-4 mannosyltransférase I (GPI-MT I), composé de PIG-M et PIG-X [54,43]. PIG-M est la sous unité catalytique [29,54]. PIG-X une protéine transmembranaire du RE qui est associé à PIG-M et nécessaire à l'expression stable de PIG-M [43].

Etape 6 : le transfert du Man-2 exige PIG-V. bien que son activité catalytique n'a pas été démontrée, PIG-V est l' α -6 mannosyl-transférase II (GPI-MT II) [54].

Etape 7 : le phosphate-éthanol-amine (EtNP) est ajouté à la position 2 du Man-1 à partir du phosphatidyl-éthanol-amine générant Man-(EtNP) Man-GlcN-(acyl) PI, le transfert de l'EtNP au Man-1 exige PIG-N qui est le GPI-éthanol aminophosphate- transférase I (GPI-ET I) [35].

Etape 8 : Man-3 est transféré de Dol-P-Man, l'enzyme clé est par l' α -2 mannosyl-transférase III (GPI-MTIII), PIG-B est une mannosyl transférase putative et fonctionne pour l'ajout de troisième mannose M3 [50].

Etape 9 : le deuxième EtNP est transféré sur le groupe hydroxyle en C-6 de M3 à partir du phosphatidyl-éthanol-amine générant une forme mûre du précurseur de l'ancre GPI, EtNPMan-Man-(EtNP) Man-GlcN-(acyl) PI. L'EtNP est transféré par GPI-ET III qui est un complexe de PIG-O et PIG-F. PIG-O est la sous unité catalytique. PIGF se lie et stabilise PIG-O [66].

Etape 10 : le troisième EtNP est ajouté à partir du phosphatidyl-éthanol-amine pour générer une autre forme de précurseur GPI mature. L'addition d'EtNP au Man-2 est médié par l'PIG-ET II composé de PIG-G et PIG-F, PIG-G est stabilisé par PIG-F [58].

Après l'étape 8, le quatrième Man (Man-4) peut être transféré à partir de Dol-P-Man pour générer un intermédiaire de quatre mannoses, qui est ensuite converti par EtNP par addition de Man-3 (étape 9) dans la troisième forme mûre de précurseurs de l'ancre GPI. Le transfert de Man-4 est médié par PIG-Z (également appelé SMP3) qui est le mannosyl-transférase α 1-2 [73].

Grâce à la technique de fusion cellulaire et d'hybridation somatique, neuf classes de complémentation ont été identifiées et caractérisées (notées de A à I) correspondant donc à neuf gènes putatifs, qui interviendraient dans la synthèse de l'ancre GPI. Trois classes de complémentation (A, C et H) sont incapables de synthétiser le premier métabolite (N-acétyl-glucosaminyl-phosphatidyl-inositol, NacGlc-PI). Cette étape nécessite donc au moins le produit de trois gènes [36].

4-Le clonage du gène PIG-A

Les mutations du gène PIG-A ont été observées chez tous les patients examinés atteints de l'HPN. L'HPN se pose à cause d'une mutation somatique du gène PIG-A dans les cellules souches hématopoïétique.

L'utilisation d'une technique puissante, appelée technique de fusion cellulaire et d'hybridation somatique ou test de complémentation a permis de spéculer combien de gènes sont impliqués dans la biosynthèse de l'ancre GPI. Plus de dix classes ont été identifiées jusqu'ici.

Cette technique consiste en la fusion de deux clones de cellules déficientes, si les cellules fusionnées récupèrent la capacité de synthétiser l'ancre GPI, les clones d'origine sont défectueux dans différents gènes, de sorte que les cellules fusionnées récupèrent un jeu complet des gènes nécessaires à la biosynthèse de l'ancre GPI. Neuf classes de complémentation ont été identifiées et caractérisées (notées de A à I) correspondant donc à neuf gènes putatifs (PIG-A, PIG-B, PIG-C, PIG-D, PIG-E, PIG-F, PIG-G, PIG-H, PIG-I) qui interviennent dans la synthèse de l'ancre GPI.

Trois classes de complémentation (A, C et H) sont incapables de synthétiser le premier métabolite le glucosamine N-acétyl Phosphatidylinositol (GlcNac-PI). La synthèse du GlcNac-PI est, selon la classification en groupe de complémentation, susceptible de faire intervenir trois gènes: les gènes PIG-A, PIG-C et PIG-H [44].

Si PIG-A est à lui seul responsable de la maladie alors que plusieurs types de protéines sont nécessaires à la synthèse de la molécule de l'ancre GPI, c'est que seulement le gène PIG-A qui est localisé sur le chromosome X au niveau du bras court (X p 22.1) alors que tous les autres gènes nécessaires à la synthèse de l'ancre GPI se localisent sur des chromosomes autosomiques [38]. Comme les hommes n'ont qu'un seul chromosome X, l'inactivation d'un gène situé sur le chromosome X provoque une perte complète de produit du gène. Chez les femmes qui ont une paire de chromosomes X, le chromosome X dans une cellule somatique peut être inactivé par lyonisation (inactivation somatique aléatoire), le produit du gène sur le chromosome X est produit à partir d'un seul gène, même chez les femmes. Ainsi, la susceptibilité à des mutations somatiques sur le chromosome X est la même entre les hommes et femmes. La localisation du gène PIG-A sur le chromosome X rend donc bien compte de l'expression phénotypique d'une mutation récessive puisque, tant chez la femme que chez l'homme un seul allèle est exprimé.

Enfin, la structure génomique de PIG-A et de son homologue murin pig-a [22] a été déterminée. Le gène PIG-A comporte six exons répartis sur 17 Kb [33].

4.1-Etude moléculaire de l'HPN

Ces découvertes fondamentales ont ouvert la voie au diagnostic moléculaire de l'HPN. En utilisant des techniques ciblées sur l'ARN messager ou sur l'ADN génomique suivies du séquençage du produit d'amplification, plusieurs équipes ont démontré que des altérations moléculaires du gène PIG-A sont présentes chez tous les patients atteints d'HPN à un degré variable.

Les anomalies sont diverses, mais il s'agit dans presque tous les cas de mutations ponctuelles (délétion, insertion ou substitution d'une ou de deux bases). Une majorité de ces mutations génère un décalage du cadre de lecture [62] dont le produit de traduction est, a priori, une molécule tronquée inactive.

Point important, les mutations décelées à ce jour se situent sur l'ensemble du gène, dans les régions codantes comme dans les introns, l'anomalie s'exprimant dans ce dernier cas par un défaut d'épissage [53]. Il n'existe donc pas de « point chaud » de mutation dans PIG-A. Ainsi malgré le fait que de telles études sont indispensables pour l'extension de nos connaissances sur le plan fondamental, il est illusoire de croire au développement d'un diagnostic moléculaire de l'HPN en pratique clinique.

Enfin, signalons le fait qu'un certain nombre de malades semblent porteurs de plusieurs anomalies génétiques de PIG-A. Ces différentes mutations affectent généralement des populations cellulaires différentes. Ces observations ont été interprétées comme la preuve que l'HPN pourrait être dans certains cas une maladie oligoclonale, le gène PIG-A étant alors considéré comme un gène hyper mutable appartenant à la famille des gènes dits « de ménage » [53].

4.2-Biologie cellulaire de l'HPN

On sait depuis le début des années 1980 que les progéniteurs médullaires, comme les cellules du sang périphérique, sont hétérogènes vis-à-vis du phénotype HPN. L'HPN est caractérisée par la coexistence, chez la majorité des patients, de cellules normales et de cellules mutées (le « clone » HPN) [53,78]

L'importance relative du « clone » HPN et l'hématopoïèse normale est variable d'un patient à l'autre, et même chez le patient lui-même durant l'évolution de sa maladie.

Des travaux ont démontré que cette hétérogénéité était bien liée à la coexistence de deux populations, GPI positive (normale) et négative (mutée).

Chez le sujet sain, la population des cellules souches médullaires (CD34+) exprime les molécules GPI suivantes : CD55, CD59 et Thy-1 (Cdw90). Chez un nombre limité de patients atteints d'HPN, il a été démontré la présence dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique de populations CD34+/CD59+ et CD34+/CD59- [89] .

D'autre part, il a été montré que la mutation PIG-A était nécessaire mais non suffisante pour entraîner une HPN, puisque présente chez certains sujets sains [69].

Ceci rejoint le modèle proposé par Rotoli et Luzzatto, selon lequel la population médullaire GPI- (issue d'une ou de quelques cellules souches) possède un avantage intrinsèque de croissance ou de survie face à un mécanisme d'agression responsable d'une aplasie médullaire [22].

Cependant, l'altération du gène PIG-A murin par recombinaison homologue (invalidation ou knock out) ne conduit pas à une expansion du clone

muté ou à un avantage de croissance des cellules embryonnaires mutées (embryonic stem cells, cellules ES) [83], et l'injection de cellules médullaires CD34+ de patients atteints d'HPN chez la souris immunodéficiente (SCID-humanisée) ne montre pas non plus d'avantage de croissance sélectif de la population mutée. Il a fallu attendre la mise au point des modèles murins où l'inactivation du gène a été réalisée de manière conditionnelle [83,63] pour mimer la maladie hémolytique, en l'absence cependant de tout avantage de prolifération des cellules PIG-A-. Ces données témoignent de la nécessité d'autres facteurs pour expliquer l'expansion du clone.

En effet, l'analyse comparative de l'expression génique de cellules CD34+ de patients atteints d'HPN (populations PIG-A mutée et non mutée) par rapport à des cellules CD34+ de sujets témoins a permis de découvrir, de manière surprenante, une homologie entre les cellules déficientes pour l'ancre GPI et les cellules CD34 de sujets sains. Inversement, les cellules CD34+ phénotypiquement « normales » d'un sujet atteint d'HPN présentent, par comparaison à des témoins non HPN, un profil d'expression anormal de gènes impliqués dans l'apoptose, la réponse immunitaire, la prolifération et la différenciation [75]. Ceci conforte l'hypothèse d'une sélection extrinsèque (facteurs environnementaux) permettant d'expliquer l'expansion du clone HPN. Quoiqu'il en soit, cette question reste très débattue.

La physiopathologie de l'HPN explique en grande partie les signes cliniques de la maladie. 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, il existe d'une part une réexpression à la surface des globules rouges des antigènes cryptiques (du système Th), d'autre part une augmentation de la production des protéines du complément. Les antigènes Th sont reconnus par le système immunitaire, celui-ci active le complément, qui n'est plus régulé par CD55 et CD59, aboutissant en une crise hémolytique. Cette hémolyse est responsable d'une hémoglobinémie aiguë, saturant les deux voies classiques d'élimination de l'hémoglobine libre : l'endocytose et la dégradation par les macrophages (liaison à l'haptoglobine et oxydation en méthémoglobine puis dégradation par le foie). L'oxyde nitrique se lie alors de façon irréversible à l'hémoglobine libre présente dans le plasma des patients [64]. La lyse intravasculaire des globules rouges provoque l'élimination dans le plasma de l'arginase érythrocytaire, responsable de la métabolisation de la l-arginine en ornithine, diminuant la disponibilité de la l-arginine, indispensable pour la synthèse de l'oxyde nitrique [65]. Le déficit en oxyde nitrique qui en découle entraîne une dysrégulation du tonus des muscles lisses et, par conséquent, des symptômes de dystonie (dysphagie, douleur abdominale et dysfonction érectile) [67]. La physiopathologie des thromboses dans l'HPN est pour l'instant méconnue mais un certain nombre d'hypothèses sont évoquées. Le déficit en oxyde nitrique entraîne une activation endothéliale, une vasoconstriction, une inflammation et la génération de thrombine [68]. L'action du complément cause aussi la formation de microvésicules ou microparticules circulantes à partir des plaquettes. Ces microparticules, riches en phospholipides, extrêmement procoagulantes *in vitro*, sont présentes à de fortes concentrations dans le plasma des patients avec HPN [70,71]. D'autres aspects de la physiopathologie de l'HPN demeurent néanmoins largement méconnus, notamment : quel est le mécanisme de l'hypoplasie médullaire ? Existe-t-il un

déficit immunitaire chez ces patients (lymphocytes GPI⁺, altération du chimiotactisme des polynucléaires GPI⁺) ?

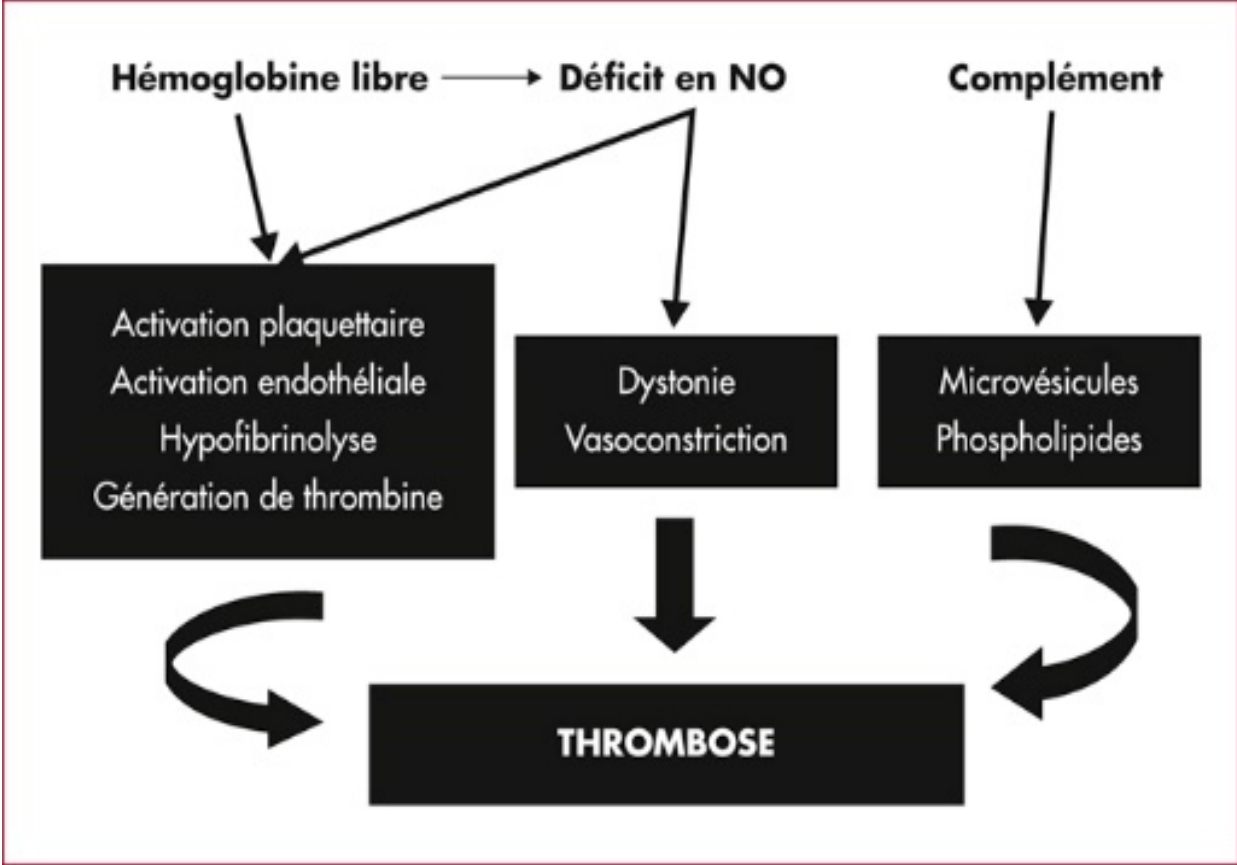
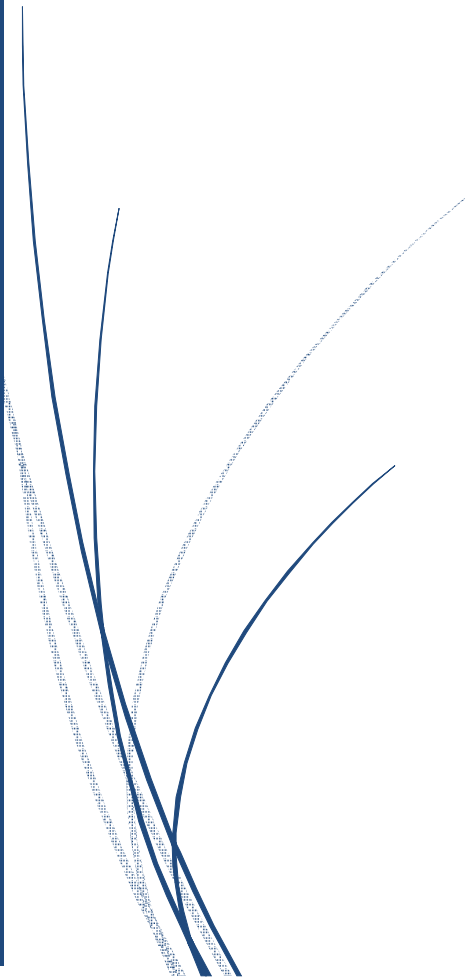


Figure 3 : Principales hypothèses expliquant la survenue de thromboses en cas d'HPN.



*DEUXIEME PARTIE :
DIAGNOSTIC DE L'HPN*



I-Description clinique de l'HPN

1-Symptomatologie :

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne est une maladie survenant au moyen âge et qui expose souvent à des erreurs de diagnostic vu la variété de la symptomatologie initiale de la maladie. L'hémoglobinurie tout comme l'anémie hémolytique sont les principaux symptômes de l'HPN. La fatigue, la coloration jaunâtre de la peau ou des symptômes d'hémolyse chronique constituent les manifestations initiales les plus fréquentes de la maladie. Le diagnostic d'HPN est souvent porté à un stade tardif car il n'est pas envisagé devant ces symptômes [45].

La forme la plus classique, sinon la plus courante, de la maladie est celle d'une anémie hémolytique acquise d'origine corpusculaire, apparaissant chez un adulte jeune, accompagnée d'urines foncées le matin (hémoglobinurie) et parfois d'un ictère modéré. L'anémie est accompagnée de signes de régénération modérée (réticulocytose) et souvent d'une leucopénie et/ou d'une thrombopénie généralement non sévères.

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.

a-Le syndrome anémique :

Il existe d'emblée dans presque tous les cas. Il s'agit d'une anémie hémolytique qui s'accompagne, initialement ou secondairement, d'hémoglobinurie paroxystique dans la moitié des cas environ.

L'anémie hémolytique sans hémoglobinurie peut être atténuée ou franche. Elle est souvent particulière par la neutropénie et/ou la thrombopénie, la fièvre, les douleurs abdominales, les céphalées, les poussées d'accentuation de l'hémolyse.

L'anémie initiale peut être celle d'une insuffisance médullaire par aplasie ou dysplasie et moelle riche, avec pancytopénie en général, et rarement neutropénie ou thrombopénie isolée.

Assez rarement, la maladie se présente comme une anémie hypochrome microcytaire sidéropénique.

b-L'hémoglobinurie :

Elle est souvent révélatrice de l'HPN mais parfois confondue avec une hématurie, elle est paroxystique dans la plupart des cas, survenant pendant le sommeil nocturne ou diurne, et intermittente. Elle peut cependant être plus prolongée et perdre son caractère paroxystique ou manquer au tableau initial qui ne comporte alors qu'une anémie [49].

Quand elle existe, l'hémoglobinurie nocturne traduit une augmentation de l'hémolyse au cours du sommeil. Elle n'est pas précisément liée au caractère nocturne, puisque le rythme peut être inversé si le malade veille la nuit et dort le jour [45].

L'abaissement minime du PH pendant le sommeil a été incriminé, comme l'a été celui qui accompagne l'effort et aussi les variations nyctémérales de la cortisolémie, mais le traitement par le prédnisone n'influence pas le rythme nocturne de l'HPN.

L'hémoglobinurie paroxystique est le plus souvent provoquée par une infection, une opération, un effort physique, les règles, une vaccination, une transfusion et certains médicaments : Sulfamides, Pénicilline, Héparine, Aspirine et Fer [46,48].

L'hémolyse provoquée par l'administration de Fer semble être liée à la stimulation de l'érythropoïèse ainsi provoquée chez un malade sidéropénique et qui donne naissance à un plus grand nombre d'hématies pathologiques.

L'hémoglobinurie intermittente peut être prolongée et non plus paroxystique, et durer plusieurs semaines.

c - Les autres signes révélateurs :

Les premiers signes de la maladie sont parfois :

- Des hémorragies en rapport avec une thrombopénie
- Une thrombose veineuse de localisation atypique : sus hépatique ou syndrome de Budd-Chiari, splénique, cérébrale, mésentérique, portale, rénale et cave inférieure
- Une pancytopénie initiale, avec insuffisance médullaire par aplasie médullaire ou dysplasie à moelle riche [49].
- Des signes généraux isolés : fièvre ; frissons ; asthénie ; céphalées
- Des lésions cutanées exceptionnelles mais grave. Elles peuvent se présenter initialement sous forme de plaques erythémateuses, devenant nécrotiques, avant d'aboutir à des bulles hémorragiques [51,52].

- Dans certains cas on note une vascularite associée
- Des douleurs abdominales épigastriques ou des hypochondres, variables, à type de crampes, accompagnées de nausées ou de vomissements, sont souvent attribuées à des thromboses des veinules ou des veines du système porte
- Des douleurs articulaires
- Des manifestations neuromusculaires à type de crampes ou de paresthésies
- Des signes fonctionnels inexplicables : douleur sternale, dysfonction érectile, dysphagie, spasme oesophagien

2-L'examen clinique :

Le tableau clinique initial riche et polymorphe contraste avec un examen clinique souvent pauvre, car en dehors des signes liés à une complication, le patient est souvent pâle et ictérique.

Une splénomégalie modérée existe dans la moitié des cas, constatée surtout à un stade tardif.

Une hépatomégalie modérée est assez fréquente [49]. Un tableau de Budd-Chiari peut être constaté en cas de thrombose des veines sus hépatiques (ascite, circulation collatérale, hypertension portale et insuffisance hépatique aigue)

Il est à noter qu'un souffle cardiaque fonctionnel méso-systolique peut être ausculté dans le cadre du syndrome anémique.

Il n'est pas exceptionnel de trouver des signes d'infections notamment pulmonaire et urinaires, surtout chez les patients neutropéniques.

Tableau 1 : clinique devant faire suspecter une HPN



Adapté de Parker 2005¹

* Syndrome myélodysplasique avec anémie réfractaire

Tableau 2 : Les symptômes cliniques de diagnostic

Symptômes	Fréquence %
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

II-Diagnostic biologique de l'HPN

1-Les tests biologiques :

1.1-Les anomalies sanguines :

L'anémie : l'hémogramme montre une anémie sévère, avec un taux d'Hb souvent inférieur à 6g/dl. C'est une anémie souvent normochrome normocytaire, et peut être aussi macrocytaire, ou parfois même hypochrome microcytaire.

L'anémie est accompagnée de signes de régénération modérée (réticulocytose) mais l'hémolyse est franche, et également accompagnée souvent d'une leucopénie et/ou d'une thrombopénie généralement non sévères.

La bilirubine non conjuguée est élevée et les hématies ont une morphologie normale, il n'y a pas de sphérocytes et la résistance osmotique est normale.

Il s'agit d'une anémie hémolytique avec haptaglobinémie basse ou nulle et très souvent hémosiderinémie permanente. Le test de Coombs est négatif.

La perte de fer par les urines peut atteindre 8mg/j [49]. L'anémie est parfois modeste et l'hémolyse difficile à affirmer avec un taux de bilirubinémie non conjuguée normale. L'hémolyse est discrète également dans les formes pancytopéniques, dans lesquelles l'anémie, d'intensité variable est le plus souvent liée à l'insuffisance médullaire lorsqu'elle est profonde.

Lorsque l'anémie est microcytaire et hypochrome avec sidéropénie marquée, l'hémolyse peut également être d'attente et n'apparaît qu'après administration de fer [49].

La leucopénie : est fréquente dans 60 % des cas et parfois sévère, elle est alors liée à une neutropénie avec lymphocytose relative. Cette leucopénie peut résulter soit d'une hypoplasie médullaire, soit d'une augmentation de la marginalisation des granulocytes sanguins. La durée de vie des neutrophiles est normale. L'activité phosphatase alcaline (PAL) est souvent abaissée et parfois même nulle [45]. La concentration d'acétylcholinestérase leucocytaire est souvent abaissée. On a mis en évidence diverses anomalies fonctionnelles des leucocytes, du chimiotactisme et de la phagocytose.

Il existe deux population de neutrophiles : une population avec un contenu en PAL normal, et une population anormale avec un contenu en PAL diminuée [45], cela est dû au fait que les PAL sont des GPI-AP.

La thrombopénie : observée dans 80 % des cas, modérée, la durée de vie et les fonctions des plaquettes, sont en général normales. La richesse de la moelle en mégacaryocytes est normale ou diminuée [45].

La pancytopénie : existe dès la découverte de la maladie dans 40% des cas, et peut être accompagnée d'une moelle plus souvent aplasique que dysplasique [46]. Une neutropénie ou une thrombopénie isolée peuvent être le signe révélateur, l'anémie hémolytique même discrète, oriente le diagnostic.

1.2-Les anomalies plasmatiques :

Le plasma peut avoir une coloration dorée pale, traduisant la présence de concentration élevée de bilirubine libre, d'hémoglobine et de methemalbumine. L'haptoglobine sérique est très diminuée et le taux de LDH peut être anormalement élevée au cours des poussées d'hémolyse intravasculaire [49]. En l'absence d'une LDH élevée, le screening pour une forme clinique d'HPN en

cytométrie classique ne se justifie pas. Bien entendu, ce critère diagnostique ne concerne pas les HPN subcliniques puisque par définition il n'y a pas d'hémolyse significative.

1.3-Les anomalies urinaires :

La concentration d'urobilinogène urinaire est très augmentée lors de la poussée d'hémolyse. Une hémolyse intravasculaire importante aboutit à une déplétion du sérum en haptoglobine. L'hémoglobinurie entraîne au niveau rénal des dépôts d'hémosidérine responsables chez 20% des patients d'une « insuffisance rénale » qui peut être sévère. Une albuminurie peut précéder ou suivre un épisode d'hémoglobinurie [45].

1.4-Les anomalies médullaires :

L'HPN n'est pas un simple diagnostic, la cytométrie sur le sang périphérique doit être associée à l'analyse de la moelle osseuse pour avoir une classification rigoureuse de la maladie. L'hyperplasie érythroblastique est l'anomalie la plus courante, jusqu'à 50% des cellules de la moelle peuvent être des érythroblastes ; dans quelques cas, il existe une mégaloblastose, le nombre de mégacaryocytes est parfois diminué [45]. L'HPN fait partie des diagnostics à évoquer devant une pancytopenie à moelle non désertique.

1.5-Etudes cytogéniques :

Le caryotype des cellules de la moelle est tantôt normal, tantôt anormal. Les anomalies cytogénétiques décrites au cours de l'HPN comportent une perte du chromosome Y, une trisomie 9, une délétion d'un segment du bras long d'un chromosome du groupe B et la disparition d'un chromosome des groupes C ou G [45]. Aucune de ces anomalies cytogénétiques ne peut être considérées comme

une aide au diagnostic d'HPN. Les études cytogéniques des cellules du sang, qui portent sur les lymphocytes, ne montrent pas d'anomalie.

2-Les méthodes de diagnostic biologique :

Les principaux tests biologiques qui permettent le diagnostic de la maladie d'HPN peuvent être divisés en deux catégories [49,55,56] :

-Les tests basés sur la sensibilité accrue des érythrocytes à la lyse médiée par le système du complément [7,8].

-Les tests qui mettent en évidence un déficit en protéines GPI grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques en cytométrie de flux [55,57].

Les tests d'hémolyse utilisant la sensibilité des érythrocytes au PH (test de HAM DACIE) ou au sucrose sont faciles à mettre en oeuvre puisqu'ils ne nécessitent pas de matériel particulier. Ils permettent un diagnostic rapide et fiable, à condition que la population érythrocytaire anormale soit suffisamment importante. Ce manque de sensibilité et le fait que le diagnostic différentiel avec d'autres syndromes, en particulier les dysérythropoïèses de type II (ou HAMPAS : Héridatary Erythroblastic Multinucléarity with a Positive Acidified Serum test), est d'interprétation délicate, ce qui fait préférer l'utilisation des anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules DAF et MIRL. Notons que des travaux ont permis d'établir une corrélation parfaite entre le degré d'hémolyse (test de HAM DACIE) et l'expression de la glycoprotéine CD55 érythrocytaire.

Devant un tableau clinique très évocateur d'HPN, le test de HAM DACIE et le test au sucrose pourraient être suffisants pour porter le diagnostic [56], cependant, la sensibilité et la spécificité de l'immunophénotypage en cytométrie de flux, permettent à la fois l'analyse de l'expression des molécules GPI sur les

lignées hématopoïétiques résiduelles normales et l'évolution du clone HPN malgré les transfusions, font actuellement préférer cette technique. Il y a également les techniques de biologie moléculaire, permettant de mettre en évidence une altération du gène PIG-A, identifié comme le gène responsable du déficit en GPI-AP dans l'HPN, mais restent actuellement des méthodes de recherche difficile à mettre en œuvre.

2.1-Les tests d'hémolyse in vitro :

2.1.1-Le test de HAM DACIE (ou test d'hémolyse en sérum acidifié) :

De nombreux tests de diagnostics ont été décrits dans cette maladie (test de Crosby, test au sucrose), le test de Ham et Dacie a retenu l'attention de la majorité des hématologues au cours de ces dernières années. Il consiste à mesurer l'hémolyse des globules rouges in vitro en présence de complément [59]. Ce test, utilisé comme critère diagnostique depuis de nombreuses années, tend aujourd'hui à être supplanté, tout comme le test au sucrose, par l'étude des molécules GPI en cytométrie de flux.

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, en permettant de mesurer l'hémolyse survenant lors de l'incubation des hématies 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 [60]) à pH (6,5 à 7). Après centrifugation, l'hémolyse est appréciée à l'oeil nu ou au spectrophotomètre par la couleur du surnagent. Les réactions témoins utilisant les mêmes échantillons sériques, mais décomplémentés par le chauffage à 56°C pendant 30 min, 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 [60].

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 [60].

Ce test ne peut pas donner une identification des autres lignées cellulaires en dehors des globules rouges, alors que la proportion des neutrophiles dans l'HPN donne une meilleure estimation sur la vraie proportion des clones HPN lorsqu'ils sont indépendants de l'hémolyse ou des transfusions récentes [59]. Ce test admet également de faux positives, en particulier chez les malades présentant une dysérythropoïèse de type II, mais dans ce cas le test de sucrose est négatif [72].

2.1.2-Le 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 de 6,3 (apport énergétique) et du sérum frais (apport de complément) provenant d'un individu normal ABO compatible [60], 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 [49]. Il est positif quand l'hémolyse est supérieure ou égale à 10 %. Sa positivité peut s'observer dans certains états dysérythroïétiques, érythroleucémies ou leucémies myéloblastiques. Ce test est moins spécifique pour l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), mais plus sensible que le test de Ham.

Les tests classiques (test de Ham et Dacie et test au sucrose) sont faciles à mettre en oeuvre puisqu'ils ne nécessitent pas de matériels particulier. Ainsi ils permettent un diagnostic rapide et fiable, à condition que la population soit suffisamment importante.

2.1.3-Le test de lyse à la chaleur :

C'est un test sensible et simple mais non spécifique et actuellement abandonné. Il mesure la lyse spontanée des hématies à la teinte rouge du sérum exsudé du sang coagulé 3h à 37°C. Il peut donner des faux positif dans les sphérocytoses héréditaires et dans les hémolyses immunologiques [49].

2.1.4-Le test de lyse par une agglutinine froide :

La fixation et l'activation du complément sur les hématies, qui entraînent leur lyse, sont obtenues avec de très faibles concentrations d'agglutinines froides en présence de complément. Ce test, positif dans d'autres dysérythroïèses congénitales ou acquises, permet en cas d'HPN une

appréciation assez précise du pourcentage de cellules anormales [49]. Cette information est également obtenue par la CMF.

2.2-Autre approche diagnostique :

FLAER : Le FLAER (Fluorescently Labelled Aerolysin) utilise la propriété de l'aérolysine (une toxine bactérienne) à se fixer aux globules rouges par l'intermédiaire de l'ancre GPI et former des canaux dans la cellule membranaire qui mène à l'hémolyse. Ce test pourrait être utilisé pour le dépistage de la PNH et peut détecter de faibles niveaux de cellules GPI déficientes. Une modification de cette approche est le développement d'un mutant, sous forme non hémolytique de la toxine qui peut se lier à l'ancre GPI sans provoquer de lyse.

L'aérolysine Fluorescente marquée se lie fortement et spécifiquement à un point d'ancrage GPI et peut différencier entre des cellules normales et cellules HPN à un niveau d'environ 0,5% [74].

L'avantage potentiel d'utiliser l'aérolysine fluorescente est qu'un seul réactif très spécifique pourrait être utilisé pour toutes les lignées de cellules à la place de l'aide de plusieurs anticorps monoclonaux pour des antigènes GPI ancrés. Cette approche doit être validés sur un grand nombre de cas de l'HPN [74].

3-Les tests immunocytologiques en cytométrie de flux :

3.1-Définition :

La cytométrie en flux (CMF) est défini comme étant une technique qui permet de mesurer sur une suspension de particules (cellules, bactéries, parasites, billes..) les caractéristiques individuelles de chaque particules telles que la taille, la forme et la complexité et n'importe quel composant ou fonction qui puisse être détecté par un composé fluorescent [79].

La cytométrie en flux est une technique avant tout objective, sensible et quantitative. Les cytomètres en flux, permettent de mesurer simultanément, sur chaque cellule, certains paramètres à une vitesse de plusieurs centaines, voire plusieurs milliers de cellules par seconde. La CMF est principalement utilisée pour mesurer la fluorescence de cellules qui ont été colorées soit par des techniques d'immunofluorescence soit par l'utilisation de sondes fluorescentes [76].

3.2-Principe de la CMF :

Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceau(x) laser et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que :

- ▀ La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules
- ▀ La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules.
- ▀ Les signaux de fluorescence
- ▀ Fluorescence émise par la cellule elle-même (autofluorescence)
- ▀ Fluorescence émise par un anticorps couplé à un fluorochrome et qui se lie spécifiquement à la cellule.

Les données ainsi recueillies se présentent sous forme de graphiques ou d'histogrammes auxquels s'ajoutent des statistiques concernant les populations cellulaires et les paramètres étudiés (% , CV, intensité de fluorescence, etc.). Le principal avantage de la cytométrie en flux est la vitesse d'acquisition des données pour un très grand nombre de cellules, permettant l'analyse de sous-

populations cellulaires complexes et/ou rares et de les trier pour ensuite les mettre en culture ou encore les analyser avec des outils de biologie moléculaire [79].

Le tri peut être défini comme la séparation physique de cellules ou de particules d'intérêt à partir d'une population hétérogène. Les cellules ou particules sont aspirées de l'échantillon et injectées une à une par une buse dans un courant continu de tampon (type PBS).

En appliquant au jet, une onde de vibration d'une fréquence et d'une amplitude déterminée, il va se rompre pour donner des gouttes à un point précis caractérisé par sa position et son temps d'apparition appelé « break of point ».

Au moment de l'interception de la cellule avec le faisceau laser, la lumière déviée et la fluorescence émise génèrent un signal qui est traité par le programme de tri afin de décider si la cellule doit être isolée ou non selon les critères définis par l'utilisateur. La distance entre le point d'impact du laser avec la cellule et le « break of point » est appelé le « drop delay ». Si une cellule d'intérêt devant être triée a été détectée, le cytomètre attend qu'elle arrive jusqu'au « break of point » pour charger la goutte. Comme celle-ci contient la cellule à trier, en passant entre les plaques de déflexion fortement chargées, elle est déviée du côté de la plaque de polarité opposée et collectée. Le mode de tri peut être modifié pour choisir un maximum de pureté ou un maximum de rendement (pour une petite et précieuse population) ou un maximum de précision dans le comptage pour un clonage [79].

Principe de fonctionnement d'un analyseur-trieur

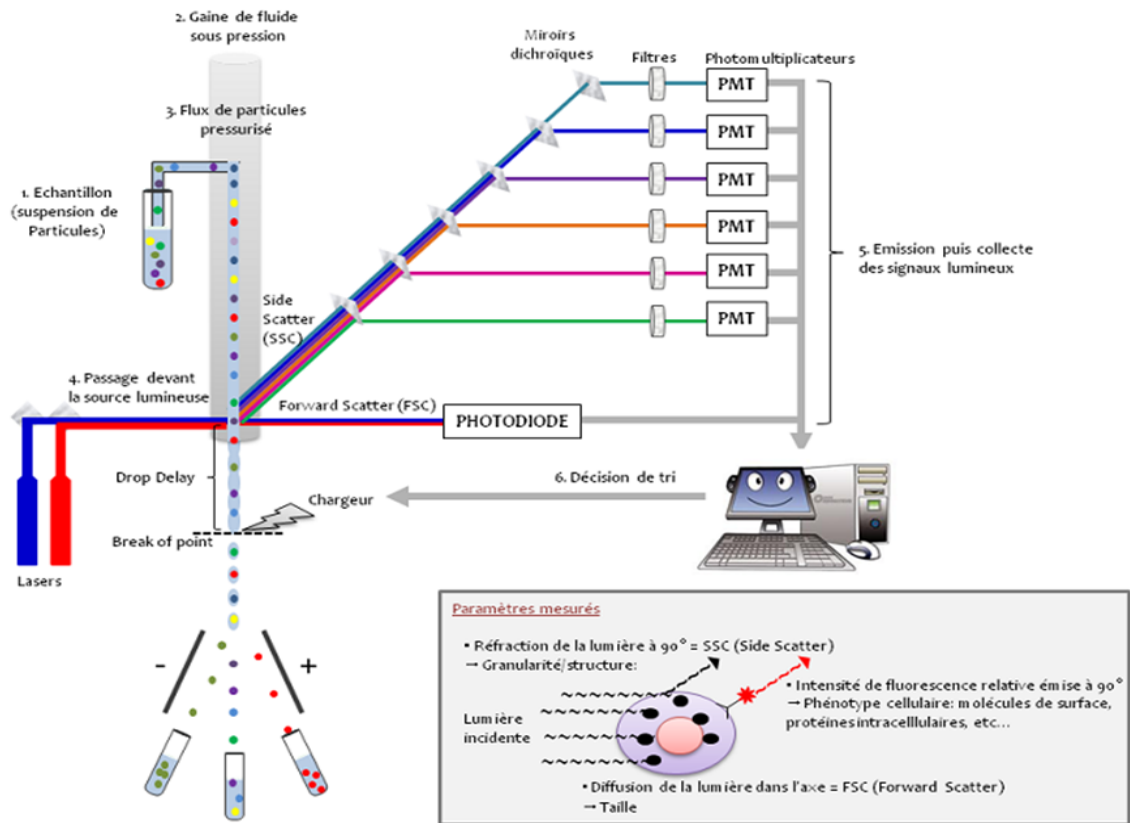


Figure 4 : Principe du fonctionnement d'un analyseur-trieur

3.3-Rôle de la cytométrie en flux dans le diagnostic de l'HPN :

Concernant l'immunohématologie, la cytométrie en flux est un outil très utile, voire irremplaçable, pour l'étude des doubles populations, la mise en évidence de sous populations d'hématies de faible fréquence (réticulocytes, hématies foetales dans la circulation sanguine maternelle) et l'analyse quantitative de l'expression des antigènes de groupes sanguins.

L'analyse de référence pour le diagnostic de l'HPN est la cytométrie en flux sur sang périphérique. Elle remplace le test classique de HAM et Dacie mesurant la lyse des érythrocytes en présence de sérum acidifié ou de sucrose.

Pour une étude initiale, la quantification d'au moins 2 molécules ancrées au GPI est nécessaire pour exclure la possibilité d'artéfact ou un déficit isolé d'une protéine GPI ancrée. Pour des patients déjà diagnostiqués, avec une maladie documentée et suivie, l'**International PHN Interest Group** recommande un contrôle annuel par cytométrie. Cependant toute altération des paramètres cliniques induit de réévaluer immédiatement la proportion du clone HPN.

Les molécules GPI ancrées les plus faciles d'accès sont le CD14 sur les monocytes, le CD16b sur les neutrophiles, le CD24 sur les lymphocytes B et les cellules myéloïdes, le CD48 sur les lymphocytes, cellules NK et monocytes, le CD52 (ou Campath 1), le CD55, le CD59, le CD73 sur les lymphocytes, le CD87, le CD108 sur les hématies.

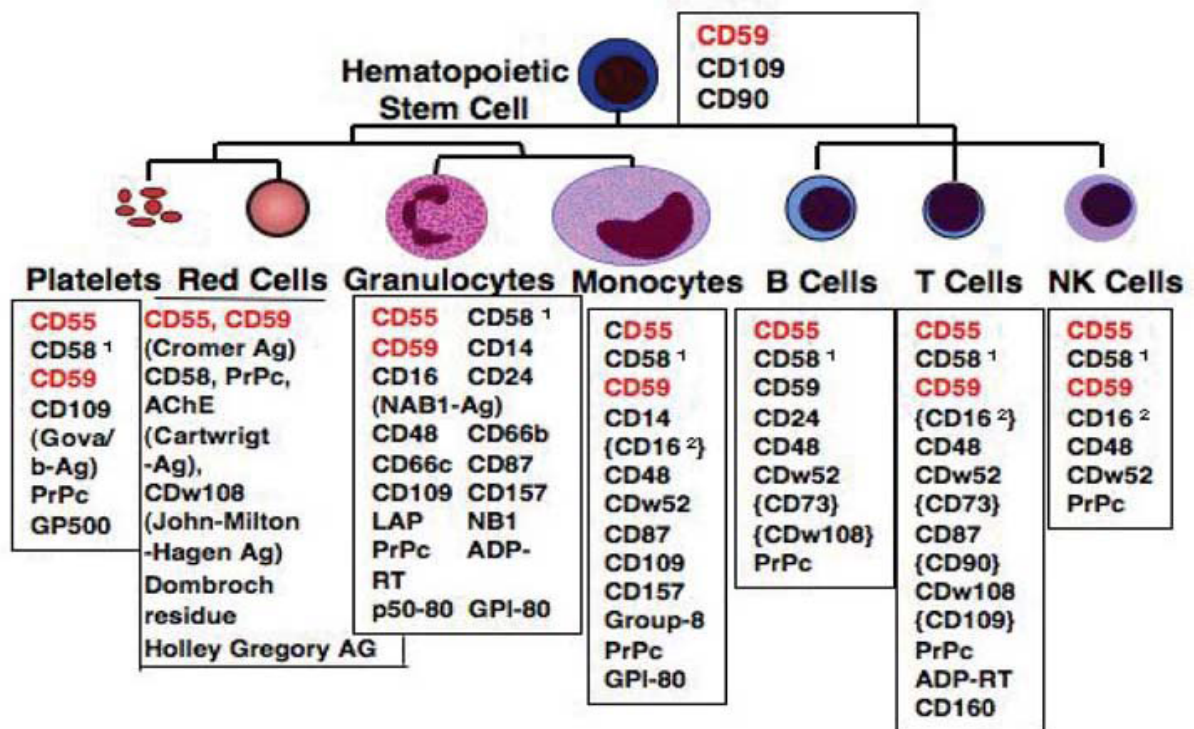


Figure 5 : Expression des protéines d'ancrage de surface GPI sur les cellules hématopoïétiques humaines

Classiquement l'analyse est réalisée en mesurant le CD55 et le CD59 sur les érythrocytes et les polynucléaires à l'aide d'anticorps spécifiques. On doit étudier les deux populations car comme il s'agit d'une maladie anémiant, les transfusions fréquentes peuvent conduire à minimiser la taille du clone sur les globules rouges. L'analyse doit donc être réalisée avant toute transfusion ou à distance d'au moins 1 mois de tout épisode transfusionnel. De plus, il apparaît parfois (5 % des cas) que l'anomalie ne soit détectable que sur les leucocytes, qui ne sont pas, ou peu attaqués par le complément et conservent donc une durée de vie normale, reflétant mieux ainsi la proportion effective du clone HPN. C'est pour cette raison qu'il est recommandé de réaliser l'analyse sur les neutrophiles et sur au moins une autre lignée cellulaire. L'analyse sur les monocytes permet de confirmer le résultat. La détection du clone dans deux lignées augmente la fiabilité du diagnostic. En revanche, se limiter à une analyse sur les érythrocytes n'est pas recommandé. L'hémolyse et les transfusions sanguines peuvent conduire à sous-estimer significativement la taille du clone HPN, voir passer à côté du diagnostic. Cette analyse est néanmoins intéressante, car elle est la meilleure option pour identifier les cellules de type II.

L'HPN classique se diagnostique facilement [80] avec l'utilisation de certains kits pré calibrés mettant en oeuvre une mesure quantitative de la population déficiente, cependant la cytométrie en flux permet d'avoir un diagnostic plus précis. En effet, outre l'identification des populations déficientes, elle permet de quantifier ces populations et surtout de mettre en évidence des taux d'expression différents de ce déficit, en particulier sur les hématies. Les érythrocytes totalement déficients en CD55/CD59 sont dits HPN III, ceux avec

une expression intermédiaire sont dits HPN II et les érythrocytes normaux sont dits HPN I.

Afin d'établir ce type de gradient d'intensité de fluorescence, il est nécessaire d'établir des témoins qui seront analysés en même temps que le patient.

L'analyse de routine est utilisée pour diagnostiquer une HPN hémolytique. Elle peut détecter un clone HPN avec une taille minimale de 1 %.

Mais dans le cas de l'HPN subclinique, le clone représente souvent moins de 0,1% de la population étudiée. La cytométrie standard, monochromatique, n'est plus suffisante, il faut recourir au moins une étude en 2 couleurs avec un fenêtrage d'exclusion précis, pour éliminer toute trace de fantômes de cellules lysées durant la préparation [81]. L'analyse de haute sensibilité qui est réalisée en couplant le CD55 et le CD59 au même fluorochrome, permet d'exclure d'emblée les déficits isolés d'un seul de ces deux marqueurs. Cette technique permet de gagner en précision ainsi que de détecter des événements 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 annuel pendant et après le traitement, même en l'absence de signes cliniques ou biochimiques d'hémolyse.

Tableau 3 : Classification d'HPN

HPN classique	HPN / insuffisance médullaire	HPN sub-clinique
-Signes d'hémolyse intra vasculaire	-Signes d'hémolyse intra vasculaire	-Pas de signes d'hémolyse -Clone CMF
-Absence anomalie médullaire associée	-Anomalie médullaire sous-jacente (Aplasie médullaire, SMD)	-Anomalie médullaire (aplasie médullaire) -Anémie réfractaire

3.4-Recommandations pour la cytométrie en flux dans le diagnostic et la gestion de l'HPN :

Pour les patients présentant des signes cliniques d'hémolyse (HPN classique et HPN / anémie aplasique)

_ Au moment du diagnostic, l'analyse par cytométrie en flux est recommandé à la fois pour les érythrocytes*et les granulocytes**.

_ Après l'établissement du diagnostic, l'analyse par cytométrie en flux est recommandé tous les 6 mois pendant 2 ans puis annuellement si les paramètres sont stables.

_ S'il existe des signes de progression clinique (ou d'amélioration), une analyse plus immédiate doit être effectuée [77].

Pour les patients souffrant d'anémie aplasique, anémie réfractaire ou SMD*** sans signe clinique d'hémolyse

_ Au moment du diagnostic, l'analyse des érythrocytes et des granulocytes par cytométrie en flux de haute précision.

_ Chaque année, même en l'absence de signes cliniques d'hémolyse (y compris les patients traités par thérapie immunosuppressive).

* Mieux vaut les effectués 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 [77].

** Analyse des granulocytes est nécessaire pour les 2 raisons suivantes:

(1) L'analyse fournit une meilleure estimation de la taille du clone HPN.

(2) L'analyse n'est pas affectée par la transfusion de globules rouges.

*** Quel que soit la cellularité de la moelle.

3.5-Résultats de la cytométrie en flux chez les patients atteints d'HPN :

Le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne par CMF permet de cibler différentes lignées hématopoïétiques (Erythrocytes et Granulocytes), détecter de très petits clones, quantifier le clone HPN, et un suivi des patients assez facile et rapide.

Le rapport de cytométrie doit contenir :

- la taille des clones de chaque lignée cellulaire testée (plus la lumière est diffractée dans l'axe du laser plus la cellule est grosse)
- la distribution des érythrocytes en types I, II et III.
- le niveau de sensibilité utilisé.

- les résultats des analyses précédentes afin de surveiller l'évolution de la taille du clone.

Les valeurs numériques issues des convertisseurs sont stockées par l'informatique et présentées sur les écrans des cytomètres sous deux formes :

- Des histogrammes monoparamétriques où l'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules.
- Des histogrammes biparamétriques ou cytogrammes présentant deux signaux simultanément.

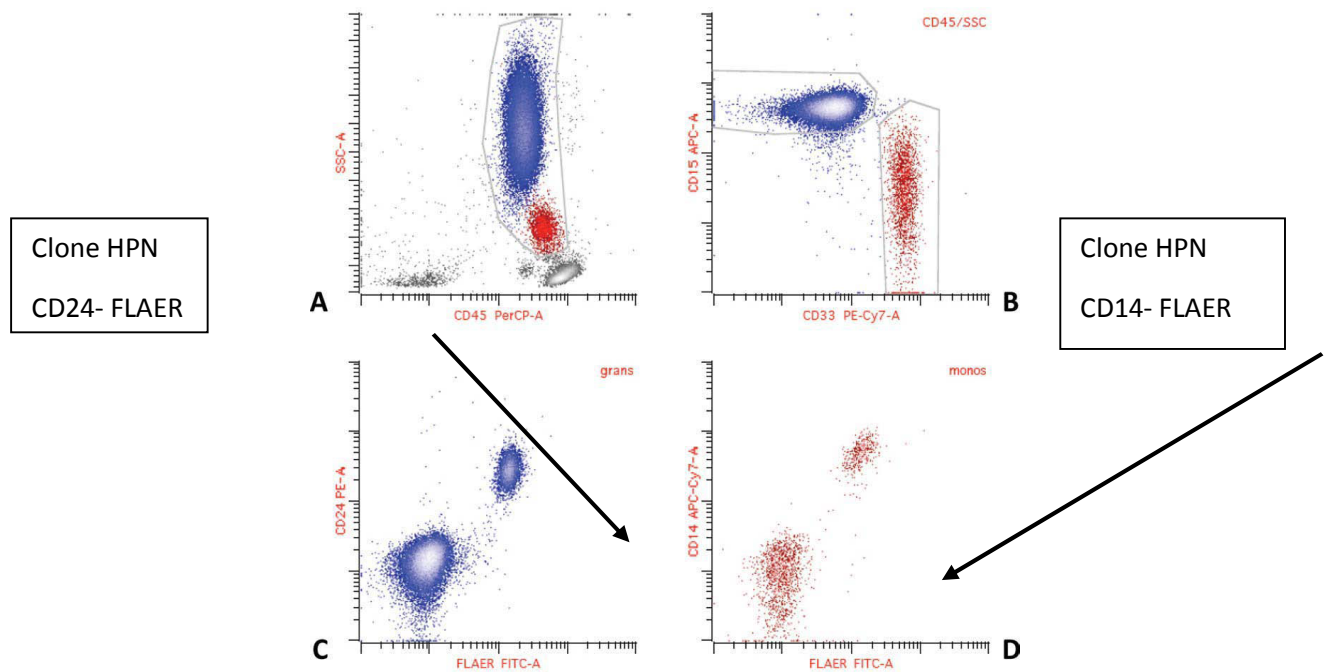


Figure 6 : Tests multiparamétrique (combinaison de plusieurs marqueurs)

CD45/CD33/CD15 (non GPI) CD14/CD24/FLAER (GPI spécifique)

III- Imagerie

Les examens d'imagerie sont nécessaires au diagnostic des manifestations thromboemboliques compliquant l'évolution de la maladie, intéressant préférentiellement le système hépato-splénique et le cerveau [82].

1-Echographie Doppler :

L'échographie doppler est une méthode de première intention pour l'examen non invasif des vaisseaux, aussi bien superficiels que profonds ainsi que pour le diagnostic et la surveillance du traitement des thromboses portales [84]. Il possède une grande sensibilité, en particulier pour le diagnostic des thromboses veineuses profondes. Ceci a été rendu possible grâce au développement des techniques couplées à l'imagerie en deux dimensions, surtout le doppler couleur. En cas de thrombose veineuse, notamment sus-hépatique, portale ou mésentérique, l'échographie doppler permet d'affirmer la thrombose par l'existence d'un matériel échogène au sein de la lumière anéchogène de ces vaisseaux.

2-Scanner ou Tomodensitométrie (TDM) :

La TDM est un examen performant pour le diagnostic de thrombose récente, aiguë ou d'infarctissement notamment hépatique, splénique ou mésentérique, cet examen nécessite l'injection de produit de contraste iodé (opacifiant), qui peut entraîner des épisodes hémolytiques au cours de cette maladie. Il recherche des anomalies qui ne sont pas visibles sur des radiographies standard ou à l'échographie [88].

3- Imagerie par résonance magnétique (IRM) :

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) visualise aussi bien que la tomodensitométrie l'anatomie du système porte. Son intérêt réside dans une meilleure capacité à caractériser les masses hépatiques et pancréatiques compliquées de thrombose portale d'où son principal avantage par rapport à la tomodensitométrie. L'IRM permet, en cas de douleur abdominale au cours d'une HPN, de faire la part entre une crise hémolytique et une complication vasculaire. Cette méthode d'imagerie doit faire partie intégrante du bilan initial d'une HPN et du suivi évolutif des malades [88].

IV- Diagnostic différentiel

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne avec un tableau clinique très polymorphe induit en erreur vers d'autre pathologie, donc il faut éliminer tous les éléments qui peuvent fausser le diagnostic [41]. L'HPN doit être distinguée des anémies hémolytiques immunes notamment de l'hémoglobinurie paroxystique au froid et de la maladie des agglutinines froides ainsi que la dysérythropoïèse de types II (HAMPAS : Héridatary Erythroblastic Multinucléarity with a Positive Acidified Serum test). En générale il faut penser à une HPN devant une anémie hémolytique inexplicée à test de Coombs direct négatif, il faut éliminer la maladie de Behçet, et l'homocystinurie familiale étant donné que l'HPN appartient avec ces deux pathologies au syndrome des antiphospholipides qui est un groupe de maladies pouvant entraîner une thrombose à la fois artérielle et veineuse. Les thromboses survenant chez des sujets jeunes doivent faire rechercher d'autres maladies thrombophiliques. En cas d'urgence et devant des douleurs abdominales, il faut éliminer les tableaux

chirurgicaux aigus en particulier : tableau d'appendicite, de péritonite, ou de colique hépatique [41].

V- Diagnostic évolutif

1- Evolution et Pronostic

L'HPN est une maladie chronique, dont l'évolution peut s'échelonner sur plus de vingt ans, émaillée d'épisodes aigus liés à l'hémolyse, aux complications de l'aplasie, aux thromboses et à l'infection.

L'intensité de ces manifestations est liée au degré de l'érythropoïèse et à la proportion de la population des GR anormaux qui varie d'un malade à un autre et dans le temps [85].

La survie actuarielle de l'HPN est de 65% à 10 ans et 45% à 15 ans.

Certaines équipes décrivent des patients en rémission complète spontanée plus de 10 ans après le diagnostic, mais même chez ces patients apparemment guéris, le défaut d'expression d'antigènes GPI dépendants persiste sur certaines sous-populations lymphocytaires [86].

Certains malades en rémission clinique gardent des anomalies biologiques. Chez d'autres tous les tests d'HPN se négativent.

Ces rémissions spontanées évoquent la possibilité avec le temps d'une perte progressive de l'avantage de croissance du clone anormal [45].

Les thromboses et les complications infectieuses représentent les causes les plus fréquentes de décès [87], 19% des sujets avec l'HPN présenteront une complication infectieuse au cours de l'évolution de leur maladie, 30%

développeront une thrombose veineuse 8 ans après le diagnostic et 50% à 15 ans [87,90]. Les hémorragies sont rarement la cause du décès.

Facteurs de pronostic :

- Le développement d'une thrombose dans le cours de l'évolution.
- Le développement d'une insuffisance médullaire.
- Une transformation myélodysplasique ou leucémique.
- Un âge supérieur à 55 ans au diagnostic.
- Une résistance à une première ligne de traitement.
- Une thrombopénie au diagnostic.
- La grossesse constitue également un facteur aggravant de la maladie, en favorisant les poussées hémolytiques et les complications (infections, hémorragies de la délivrance). Des avortements et des morts in utero sont fréquents, mais certaines grossesses ont pu être menées à terme [86].

2-Hémopathies associées :

2.1- Aplasie et HPN :

Une aplasie classique idiopathique, ou secondaire, en particulier aux médicaments, au benzène [48], peut être le premier signe d'HPN.

L'existence d'une hémolyse, toujours fruste dans ces cas, peut faire évoquer le diagnostic, mais ce sont essentiellement les tests biologiques systématiques qui l'établissent parfois, c'est au moment de la requise de l'erythropoïèse ou longtemps après une rémission, complète ou non, de l'aplasie, que l'HPN se manifeste.

2.2- Myélosclérose et HPN :

L'association d'emblée de ces deux syndromes est décrite. Parfois, il y'a évidence de précession de la myélosclérose [49], le test de test de HAM est parfois négatif et le test au sucrose est positif.

2.3-Autres hémopathies et HPN :

Les signes cliniques et/ou biologiques de l'HPN sont constatés à l'occasion d'autres maladies, qu'elle précède parfois.

Il s'agit de leucémies myéloïdes chroniques (LMC) [49], de thrombocytémies, d'erythroleucémies, de dysplasies hématopoïétiques ou myélodysplasiques [46], de leucémies lymphoïdes chroniques (LLC), de syndromes lymphoprolifératifs [49] ou de myélome [46].

3- Complications :

3.1-Les thromboses :

C'est la complication majeure de l'HPN qui atteint un malade sur deux. Ce sont des thromboses veineuses dont la gravité est corrélée au degré de l'hémolyse et dont la pathogénie semble multiple : libération de facteurs thrombo-plastiques et d'ADP par les hématies lysées, libération de facteurs pro-coagulants par les plaquettes agressées par le complément [72].

Les formes d'HPN compliquées de thromboses sont caractérisées par la variabilité de leurs localisations. Dans certaines formes silencieuses, le thrombus peut ne pas être découvert qu'au moment de l'autopsie. La symptomatologie est polymorphe et varie en fonction de la localisation (veines cérébrales, splénique, rénale, porte, mésentériques et surtout intra et sus-hépatiques responsables du syndrome de Budd-Chiari) [94].

a-Les thromboses des veines abdominales :

Intéressent la veine splénique ou porte, entraînant une augmentation douloureuse et rapide du volume de la rate et parfois sa rupture [91].

Les thromboses mésentériques sont considérées comme étant très fréquentes et responsables, dans la majorité des cas, des douleurs abdominales qui existent dans 2/3 des cas [49].

Ces douleurs, souvent intenses, durables, posent le problème d'une intervention chirurgicale. Lorsque l'opération paraît justifiée, on constate des thromboses mésentériques, parfois des infarctus intestinaux. Elles sont parfois associées à une thrombose cave, qui peut être latente.

Ces associations entraînent des douleurs abdominales, prise de poids, œdème des membres inférieurs, augmentation du volume de l'abdomen.

b-Les thromboses des veines hépatiques et sus-hépatiques :

Sont fréquentes. Il est très important d'identifier ces localisations, qui sont d'un pronostic très sombre et représentent 20% des causes de mortalité des HPN, car elles seraient favorablement influencées par l'héparinothérapie prolongée.

Le Syndrome de Budd-Chiari aboutissant à l'ascite, l'hypertension portale et l'insuffisance hépatique, est la conséquence de ces thromboses. Il représentait près de la moitié des thromboses viscérales de l'HPN. On en décrit des formes aiguës et des formes insidieuses :

-La forme aiguë, de caractère pseudo-chirurgical, est généralement mortelle en l'absence de traitement [92] et se manifeste par des douleurs abdominales soudaines, des vomissements, une diarrhée, une fièvre, un ictère, un état de

choc, une hépatomégalie franche et douloureuse (sans reflux hépato-jugulaire, avec parfois une ascite et un épanchement pleural droit), des oedèmes des membres inférieurs par obstruction de la veine cave inférieure.

-Les formes chroniques, et donc insidieuses, sont mortelles à long terme, et sont également caractérisées par une hépatomégalie [49], des douleurs abdominales, une fièvre, un ictère et une diarrhée.

Le diagnostic, difficile parfois, serait aidé par l'échographie et le scanner, mais l'échographie renseigne mieux sur le nombre et le siège des veines obstruées.

c-Les thromboses cérébrales :

Les thromboses cérébrales sont également fréquentes et graves. Elles entraînent des convulsions, paralysie, aphasie, coma [93], qui sont d'installation subite, parfois précédées de céphalées. Ces dernières, isolées, durables et très pénibles, sont communes.

Le diagnostic peut être aidé par la TDM et éventuellement par l'artériographie cérébrale ; si elle paraît justifiée ; qui montre l'occlusion veineuse habituelle.

Il s'agit de thromboses du sinus longitudinal supérieur, des sinus latéraux, des veines corticales de la convexité ou des sinus caverneux [49].

d-Les thromboses des veines rénales :

Les thromboses des veines rénales sont incriminées dans les insuffisances rénales aiguës et peuvent expliquer certaines insuffisances rénales chroniques par infarctus et nécroses papillaires, reconnus sur l'urographie intraveineuse ou aux autopsies.

Les douleurs lombaires, qui sont courantes dans l'HPN, doivent faire évoquer ces localisations thrombotiques.

L'insuffisance rénale peut résulter d'infections urinaires à répétition.

e-Les autres thromboses veineuses :

Elles peuvent intéresser les extrémités (thrombophlébites des membres inférieurs), les veines dermiques (entraînant un érythème et douleur, voir un syndrome ressemblant au purpura fulminans) [95,97], les veines epididymaires (donnant un diagnostic différentiel avec une orchite), les corps caverneux (responsable de priapisme) [96], et une embolie pulmonaire [99].

3.2-Les infections :

Elles sont fréquentes, on les attribue à la neutropénie ou à une neutropathie (diminution de la PAL, saturation du système reticulo-endothélial résultant de l'hémolyse chronique).

A germe variés et à localisations multiples, ces infections sont avant tout broncho-pulmonaires, oto-rhino laryngées ou génito-urinaires et constituent un élément de pronostic défavorable. Elles sont responsables de la mort de 10% des malades [49].

Les infections, même banales, peuvent entraîner une accentuation de l'hémolyse et parfois une insuffisance médullaire aplasique ou dysplasique [98].

3.3-Les hémorragies :

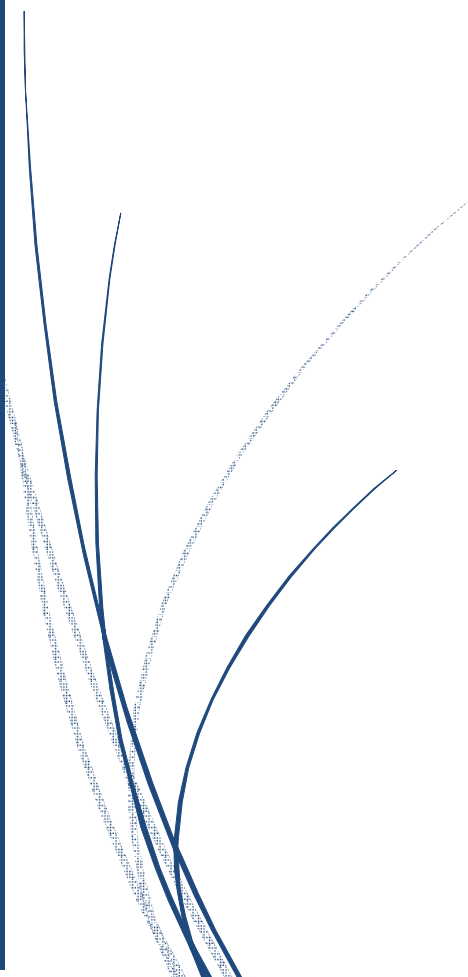
Sous forme de purpura, épistaxis, gingivorragies ou hémorragie digestive. Elles sont en règle liées à la thrombopénie lorsque celle-ci est inférieure à 20.000Plq/mm³. Elles s'observent dans 15% des cas [87].

D'autres complications sont également observées, très probablement iatrogènes, tel que l'hémochromatose [87].

Toutefois, l'hémosidérinurie habituelle atténue la surcharge en fer, constatée dans les anémies hémolytiques chroniques d'autre origine, et peut même aboutir à une véritable carence martiale [99].



*TROISIEME PARTIE : ATTITUDE
THERAPEUTIQUE DE L'HPN*



La conduite à tenir devant une HPN est très compliquée par l'extrême variabilité du tableau clinique. La rareté de cette maladie a longtemps conduit à l'emploi de thérapeutiques variées dont l'intérêt potentiel était difficilement évaluable. La tendance naturelle de la maladie à s'exacerber par des crises hémolytiques déclenchées par des médicaments, exercices physiques violents, stress psychique, grossesse, hyper alimentation , doit être enseignée aux patient afin qu'il puissent les éviter dans la mesure du possible.

La prise en charge de l'HPN a toujours reposé sur le traitement symptomatique, mais l'arrivée de l'Eculizumab a profondément modifiée la stratégie thérapeutique, qui dépend actuellement du stade évolutif de la maladie [100].

1-Traitements spécifiques

1.1-Eculizumab :

Eculizumab ou de son nom commercial *Soliris** est un anticorps monoclonal dirigé contre la fraction C5 du complément. C'est un médicament qui a profondément modifié la prise en charge de l'HPN [101]. L'éculizumab se fixe spécifiquement et avec une forte affinité sur la fraction C5 du système du complément dans la région N-terminale de sa chaîne alpha. Cette région comprend le site de clivage par les C5 convertases. En se fixant sur la région clé pour l'activité enzymatique des C5 convertases, l'éculizumab inhibe le clivage du C5 en C5a et C5b.

Parmi les différents éléments de la cascade du complément, la cible C5 est particulièrement intéressante car d'une part, toutes les voies d'activation du complément passent par C5, et d'autre part, l'inhibition de son clivage empêche

la formation de C5a, molécule hautement pro-inflammatoire, et de C5b, molécule indispensable à la formation du complexe d'attaque membranaire, élément clé impliqué dans la lyse érythrocytaire. Par ailleurs, la cible de l'anticorps se trouvant exclusivement sur la voie effectrice terminale, les composants précoces de l'activation du complément, essentiels à l'opsonisation des microorganismes et à la clairance des complexes immuns, sont préservés.

Il est réservé à l'usage hospitalier et ne peut être prescrit que par les hématologues ou les internistes. Le traitement par éculizumab nécessite une phase thérapeutique initiale de cinq semaines suivie d'un traitement d'entretien. Le schéma posologique est le suivant : quatre perfusions hebdomadaires (en 25 à 45 minutes) de 600 mg, puis dès la cinquième semaine perfusions de 900 mg toutes les deux semaines. Le contrôle de l'hémolyse est vérifié par des dosages réguliers du taux de LDH. Un ajustement de l'intervalle de doses peut s'avérer nécessaire dans certains cas avec un raccourcissement de l'intervalle à 12 jours. La tolérance est bonne. Les céphalées sont l'effet indésirable le plus couramment observés, d'intensité légère à modérée et ne persistant pas au delà de la phase d'administration initiale. Les autres événements rapportés sont : rhinopharyngites, nausées, fièvre, myalgies, fatigue, et infections à Herpes simplex Virus [102,103].

L'activation terminale du complément étant inhibée par l'écuzumab, les patients traités présentent une susceptibilité accrue aux infections à méningocoque (*Neisseria meningitidis*). Des recommandations ont été émises par l'Afssaps pour prévenir ce risque. Il est nécessaire de vacciner les patients au moins deux semaines avant l'initiation du traitement par un vaccin tétravalent A,C,W,Y135 conjugué.

L'éculizumab réduit significativement les critères biologiques d'hémolyse (LDH, hémoglobine libre), les besoins transfusionnels, les thromboses et le risque d'aggravation de l'insuffisance rénale [102,103,104,105]. De manière cliniquement et statistiquement significative, les patients traités par éculizumab sont moins fatigués et présentent une amélioration de leur qualité de vie. Cette amélioration de la qualité de vie et de la fatigue observée sous éculizumab indépendamment du degré d'anémie indique le rôle propre de l'hémolyse intravasculaire et du déficit en monoxyde d'azote dans l'altération de la qualité de vie présentée par les patients HPN.

Chez la femme enceinte, l'éculizumab ne doit être administré que si son usage est manifestement nécessaire. Chez la femme allaitante, l'allaitement doit être interrompu et jusqu'à cinq mois après le traitement. La forme classique, hémolytique, sans cytopénie est une indication non discutable au traitement par éculizumab. Dans la forme aplasique, l'éculizumab pourra être discuté seulement si cette forme aplasie HPN s'accompagne d'une hémolyse [106].

Dans le cadre du suivi des patients traités par éculizumab, les patients sont prélevés avant chaque administration d'éculizumab afin de disposer d'une cinétique précise. Les tests sont effectués sur du sang veineux périphérique. Le bilan d'hémolyse inclut un hémogramme, dosage d'haptoglobine, d'orosomucoïde, de LDH, de bilirubine totale, conjuguée et non conjuguée, d'hémoglobine glyquée, une mesure des résistances osmotique et mécanique érythrocytaires, des tests directs (TDA) et indirects à l'antiglobuline humaine et une recherche d'agglutinines froides [107].

1.2-Les immunosuppresseurs :

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.

L'aplasie peut être améliorée par un traitement immunosuppresseur qui constitue le traitement de première ligne de la majorité des aplasies médullaires sévères [108]. 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 [108].

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 [108].

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 [108].

1.4-Les Corticostéroïdes :

Ils peuvent rendre service pour palier à l'inflammation notamment au moment des crises hémolytiques et douleur abdominale aiguë [109].

1.5-La Greffe de Moelle dans l'HPN :

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.

Les trois indications classiques de la greffe de moelle osseuse 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% [110].

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.

2-Traitements symptomatiques et préventifs

2.1-Les Anticoagulants :

Les anticoagulants comme l'héparine sont indiqués dans les thromboses, mais la place des anticoagulants est loin d'être claire. En cas de thrombose avérée, le traitement anticoagulant n'est en aucun cas protecteur à 100% du risque de récurrence de thrombose [44].

Une prévention primaire des thromboses est mise en place chez les patients Européens et Afro-américains, quand le clone granuleux GPI (-) dépasse 50 %, on utilise les antivitamines K avec un INR situé entre 2 et 3, le risque hémorragique de ce traitement n'étant pas nul (deux hémorragies sévères pour 100 patient/années de traitement), il faut tenir compte dans son indication de l'âge, des comorbidités, et de la compliance au traitement [111].

La prévention secondaire chez les patients ayant présenté une thrombose repose sur les antivitamines K à vie avec un INR entre 2 et 3 ; en cas d'inefficacité, il faut obtenir un INR entre 3 et 4, ou utiliser les héparines de bas poids moléculaire. Les antiagrégants plaquettaires ne sont pas conseillés, car ils n'ont pas prouvé leur efficacité et augmentent le risque hémorragique.

Le traitement préventif par l'héparine de bas poids moléculaire est mis en place pendant toute la durée de la grossesse (avec éventuellement utilisation des antivitamines K au cours du deuxième trimestre) [112].

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

2.2-Les Transfusions :

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 [112].

2.3-Le Traitement Martial :

Souvent justifié par sidéropénie, il peut majorer l'hémolyse en favorisant l'erythropoièse à partir du clone pathologique [113].

Qu'il soit per os et surtout par voie parentérale, il est contre indiqué en raison du risque de déclenchement de la crise hémolytique.

2.4-L'acide folique :

L'apport de folate est indispensable et bien que fréquemment prescrit, jamais personne n'a décrit de déficit en cette vitamine chez un patient avec l'HPN [96].

2.5-L'EPO :

Les patients anémiques présentent un taux d'EPO élevé mais certains patients semblent avoir obtenus une rémission à long terme durable après traitement par forte dose d'érythropoïétine [114].

2.6-Les antalgiques et antispasmodiques :

Des antalgiques simples associés ou non à des antispasmodiques peuvent être utilisé provisoirement pour les douleurs abdominales pour soulager le patient. La morphine sera utilisée en cas de douleur intense avec plusieurs précautions d'usage [106].

3-Mesures Préventives

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 Eculizumab [115].

4-Indications

Certaines situations cliniques sont simples. La forme classique, hémolytique, sans cytopénie est une indication non discutable au traitement par éculizumab. La forme aplasique (syndrome aplasie HPN) doit être considérée avant tout comme une aplasie non HPN avec les conséquences thérapeutiques que cela implique (greffe géno-identique si donneur familial, traitement

immunosuppresseur si absence de donneur). Dans la forme aplasique, l'éculizumab pourra être discuté seulement si cette forme aplasie HPN s'accompagne d'une hémolyse.

Quoique l'allogreffe soit indiqué en cas d'aplasie médullaire, de complications thrombotiques répétées ou de crises hémolytiques sévères récurrentes, la décision finale revient au spécialiste.

La place du traitement anticoagulant est largement discutée, car si le traitement prophylactique par antivitamine K est recommandé en cas de taille du clone supérieure à 50%, le risque hémorragique qu'il induit est toutefois considérable. La discussion de la nécessité ou pas d'un traitement anticoagulant dépendra de chaque patient et du rapport bénéfice risque du traitement.

HPN et Grossesse

Les femmes atteintes d'HPN peuvent avoir une morbidité et une mortalité accrue au cours de la grossesse [116]. 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.

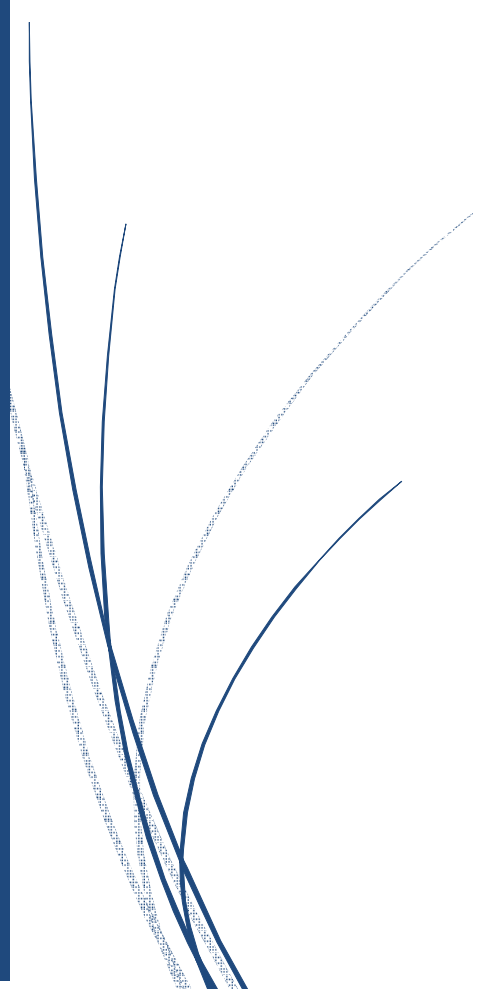
Chez les femmes atteintes d'HPN, l'anémie due à une hémolyse, une insuffisance médullaire sous-jacente, ou les deux s'aggravent souvent pendant la grossesse. En raison de préoccupations de risques pour le fœtus ou la mère de l'exposition à un traitement potentiellement toxique, la transfusion est le pilier de la gestion. Il n'y a aucune expérience avec les inhibiteurs du complément comme l'Eculizumab 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% [41], et ces événements sont associés à un risque élevé de mortalité [116] 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.



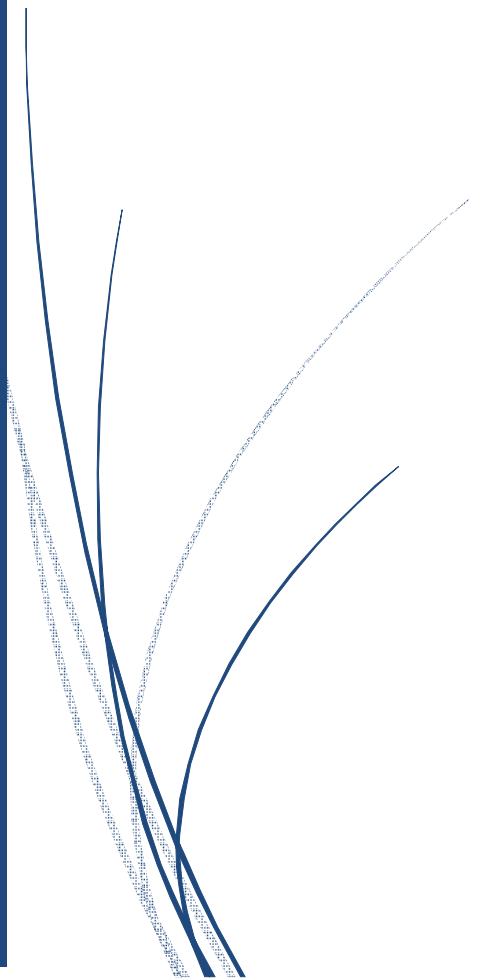
CONCLUSION



L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est un trouble rare de la moelle osseuse qui se manifeste par une anémie hémolytique, une thrombose et des cytopénies du sang périphérique. L'absence de deux protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI), CD55 et CD59, entraîne une activation incontrôlée du complément qui explique l'hémolyse et d'autres manifestations de l'HPN. La déficience en protéine d'ancrage GPI est presque toujours due à des mutations somatiques de la phosphatidylinositol glycanase classe A (PIGA), un gène impliqué dans la première étape de la biosynthèse de l'ancrage GPI; Cependant, d'autres mutations qui causent l'HPN ont récemment été découvertes. En outre, il a été démontré que les mutations de la lignée germinale hypomorphique PIGA qui ne causent pas l'HPN sont responsables d'une affection connue sous le nom d'anomalies congénitales multiples - hypotonie - syndrome de convulsions. L'Eculizumab, un anticorps monoclonal de première classe qui inhibe le complément terminal, est le traitement de choix pour les patients présentant des manifestations sévères d'HPN. La greffe de moelle osseuse reste le seul remède contre l'HPN, mais devrait être réservée aux patients ayant une réponse sous-optimale à l'Eculizumab.



RESUMES



Résumé

Titre : Hémoglobinurie paroxystique nocturne infraclinique : apport de la cytométrie en flux

Auteur : FOUIMTIZI Jaafar

Rapporteur : MASRAR Azlarab

Mots clés : Hémoglobinurie paroxystique nocturne, Gènes et protéines GPI, CD55, CD59, Cytométrie en flux.

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), ou maladie de Marchiafava et Micheli, est une maladie rare de la cellule souche hématopoïétique, due à une mutation somatique acquise du gène PIG-A. Il en résulte un blocage de la synthèse des molécules d'ancrage du glycoposphatidylinositol (GPI), responsables de la fixation de nombreuses protéines à la surface cellulaire. Parmi celles-ci, on retrouve le CD59 et le CD55, protéines inhibitrices du complément, qui empêchent normalement l'assemblage final du complexe d'attaque membranaire (CAM). La triade clinique classique associe une hémolyse intravasculaire, une hypoplasie médullaire de degré variable et des thromboses. Les progrès réalisés ces dernières années par la cytométrie en flux en font l'outil diagnostique de référence, par une mise en évidence du déficit des molécules GPI liées. Sur le plan nosographique, on oppose l'HPN classique, essentiellement hémolytique, à la forme aplasique (syndrome aplasie-HPN), ou le clone peut être retrouvé au diagnostic ou durant l'évolution de la maladie. Le facteur pronostique majeur de l'HPN reste la survenue de complications thromboemboliques, de localisations souvent atypiques – veines du système porte (syndrome de Budd-Chiari) et cérébrales –, qui constitue la plus importante cause de morbidité et de mortalité chez ces patients. Sur le plan thérapeutique, la forme classique de la maladie a bénéficié de l'avènement de l'Eculizumab, anticorps dirigé contre la partie C5 du complément. La forme aplasique est une indication d'allogreffe en cas de donneur géno-identique ou de traitement immunosuppresseur en l'absence de donneur familial.

Abstract

Title: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria subclinical : contribution of flow cytometry

Author : FOUIMTIZI Jaafar

Reporter: MASRAR Azlarab

Keywords: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Protein and gene PIG-A, *CD55*, *CD59*, *flow cytometry*.

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare acquired disorder of hematopoietic stem cells. PNH is related to a somatic mutation in the phosphatidylinositol Glycan class A (PIG-A), X-linked gene, responsible for a deficiency in glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-AP). The lack of one of the GPI-AP complement regulatory proteins (CD59) leads to hemolysis. The disease is diagnosed with hemolytic anemia, marrow failure or episodes of venous thrombosis. The diagnosis is based on flow cytometry, which allowed direct quantification of the GPI-AP-deficient cells. From earlier descriptions, the clinical polymorphism of PNH has been recognized by two presentations; one form, predominantly haemolytic without overt marrow failure, referred to Classic PNH, and the other one, with marrow failure, was often described as the aplastic anemia PNH syndrome (AA-PNH). Thromboses remain a major life threatening complication affecting outcomes in each of the disease subcategories. Thrombotic events are characterized by involvement of unusual sites (hepatic, mesenteric, cerebral, dermal veins). In classic PNH, recent studies have focused on inhibiting the complement cascade with encouraging clinical results using Eculizumab, a C5-inhibitor humanized monoclonal antibody. Concerning the AA-PNH syndrome, bone marrow transplantation (BMT) is the reference treatment in young patients with a sibling donor. Immunosuppressive therapy remains an important treatment modality in this subcategory for patients without a donor or ineligible for BMT. Recurrent thrombotic events remains even now associated with bad prognosis, whatever the form of the disease.

ملخص

العنوان: الهيموغلوبينية الانتبايية الليلية تحت الإكلينيكي: مساهمة التدفق الخلوي.

من طرف: فوم تيزي جعفر

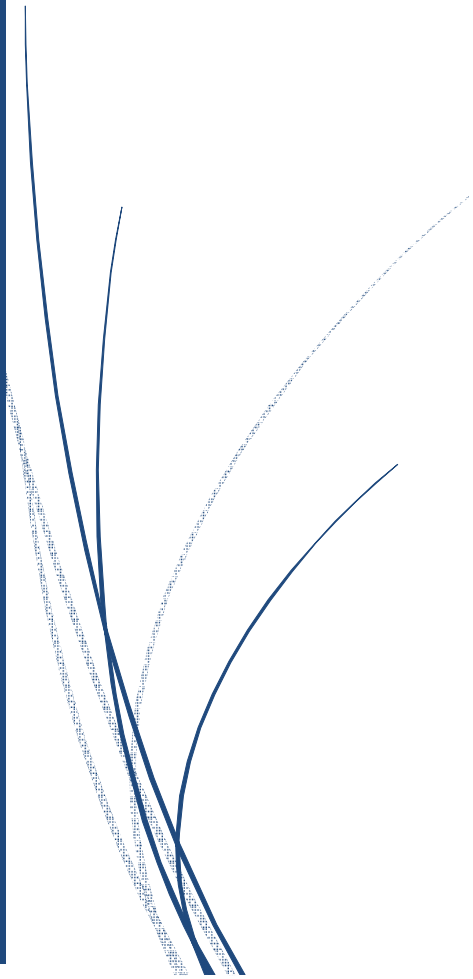
الكلمات الأساسية: الهيموغلوبينية الانتبايية الليلية، تدفق الخلوي اللاتسجي ، CD 59 ,CD55 ، الجين والبروتين GPI

الهيموجلوبين الليلي الانتباي أو مارشيا فافاميشيلي، هو مرض نادر من الخلايا الجذعية المكونة للدم، ويرجع ذلك إلى اكتساب طفرة جسدية في الجين PIG-A وهذا يؤدي إلى انسداد تركيب جزيئات رسو من غليكوفوسفاتيديلينوسيتول (GPI)، المسؤولة عن تثبيت العديد من البروتينات على سطح الخلية. ومن بين هذه CD59 و CD55، و البروتينات المثبطة للتكميلية، والتي عادة ما تمنع التجمع النهائي للمجمع غشاء (CAM). يرتبط الثلاثية السريرية تربط بين انحلال داخل الأوعية الدموية، نقص تنسج الظهارة بدرجات متفاوتة، و تجلط الدم. التقدم المحرز في السنوات الأخيرة بفضل (Cytométrie en flux) في تدفق جعله أداة تشخيصية مرجعية، من خلال تسليط الضوء على عجز جزيئات (GPI) المرتبطة. على مستوى نوسوغرافي، نعارض (HPN) الكلاسيكي، المحازل أساسا، للشكل اللاتسجي (متلازمة

عدم تنسج-HPN)، بحيث يمكن العثور على الاستساخ في التشخيص أو أثناء تطور المرض. يبقى عامل النذير الرئيسي في (HPN) حدوث مضاعفات الانصمام الخثاري، في كثير من الأحيان الأوردة غير نمطية للنظام البوابة (متلازمة Budd-Chiari) و الأوردة الذماغية- وهو أهم سبب للوفيات لدى هؤلاء المرضى. علاجيا، استفاد الشكل الكلاسيكي من المرض في الواقع مع ظهور (Eculizumab)، وهي الأجسام المضادة الموجهة ضد الجزء C5 من الملحق. الشكل اللاتسجي هو مؤشر على الزرع في حالة تطابق المتبرع أو مؤشر على علاج مثبط للمناعة في غياب جهة مانحة من الأسرة.



REFERENCES



- [1] **Peffault de Latour R, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, et al.** Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 2008; 112:3099–106.
- [2] **GULL WP.** A case of intermittent hematuria with remarks. *Guy's Hospital reports* 1866 ; 12 : 381.
- [3] **Strubing P.** Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Deutsche Med Wsch* 1882 ; 8 : 1-17.
- [4] **Hijman S, Van Der Berg A.** Ictère Hémolytique avec crises hémoglobinuriques. *Fragilité globulaire* 1911 ; 31 : 63.
- [5] **Marchiafava E.** Anemia emolitica con emosiderinuria perpetua. *Policlinico (Sez. Med)* 1928,35 : 109-17.
- [6] **Micheli F.** Anemia (Splénomégalie) emolitica con emoglobinuria, emosiderinuria tipo MARCHIAFVA. *Hematologica* 1931 ; 12 : 101-23.
- [7] **Hartman RC, Jenkins DE.** Diagnostic specificity of sucrose hemolysis test for HPN. *Blood* 1970 ; 35 : 462-75.
- [8] **Ham TH, Dingle JH.** Studies on destruction of red blood cells II chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria : certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J Clin Invest* 1939 ; 18 : 657-72.
- [9] **M.G. Low, J.B. Finean.** *Biochem J.* 1977 ; 167 : 281-284.

- [10] **H. Ikezawa, M. Yamaguchi, T. Taguchi, T. Miyashita, T. Ohyabu,** Biochim. Biophys. Acta 450. 1976 ; 154-164.
- [11] **A. Nicholson-Weller, J. Burge, D.T. Fearon, P.F. Weller, J.** Immunol. 129 (1982) 184-189.
- [12] **A. Nicholson-Weller, D.B. Spicer, K.F. Austen,** N. Engl. J. Med. 312 (1983) 1091-1097.
- [13] **M.A. Davitz, M.G. Low, V. Nussenzweig,** J. Exp. Med. 163 (1986) 1150-1161.
- [14] **E.M. Medof, E.I. Walter, W.L. Roberts, R. Haas, T.L. Rosenberry,** Biochemistry 25 (1986) 6740-6747.
- [15] **Issaragrisil S.** Epidemiology of aplastic anemia in Thailand. Thailand aplastic anemia study group. Int J Hematol 1999;70:137-40.
- [16] **Marie-Agnès Dragon-Durey, Jean Yves Cesbron, Alain Chevaller, Christian Drouet, Béatrice Uring-Lamber.** Le système du complément. Assim. Refer. 82-10.
- [17] **Nicholson-Weller A, Spiecer DB, Austen KF.** Deficiency of the complement regulatory protein, «Decay-accelerating factor », on membranes of granulocytes, monocytes, and platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. New England Journal of Medicine 1985 ; 312(17) : 1091-7.
- [18] **Wendell F. Rosse.** (2004) Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria.Orphanet Encyclopedia.

- [19] **Terra, R.** (2011). La cytométrie en flux et le dépistage de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN):quoi de neuf ?.
- [20] **Muller-Eberhard HJ.** Molecular organisation and function of the complement system. Annular review of biochemistry 1988 ; 57 : 321-47.
- [21] **Kinoshita T, Medof Me, Silber R.** Distribution of decay-accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with PNH. Journal of experimental medicine 1985 ; 162(1) : 75-92.
- [22] **G. Socié, R. Peffault de Latour, J.-Y. Mary.** (2010).Hémoglobinurie paroxystique nocturne. Elsevier Masson SAS [13-006-D-25].
- [23] **Cadwell V .** Hemoglobinurie paroxystique nocturne. Revue du praticien 1993; 43: 11.
- [24] **Orleans, P., Menon, A.K.** (2007). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned stop worrying and love glycopospholipids. J lipid Res 48:993-1011.
- [25] **Rosse WF.** Phosphatidylinositol linked proteins and PNH. Blood 1990 ; 75 : 1595-601.
- [26] **Hill A, Platts PJ, Smith A et al.** (2007).The incidence and prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. Haematologica ; 92[suppl.2] : 25.

- [27] **Hill A, Richards SJ, Hillmen P.** Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2007;137:181–92.
- [28] **Watanabe, R., Murakami, Y., Marmor, M.D., Inoue, N., Maeda, Y., Hino, J., Kangawa, K., Julius, M., and Kinoshita, T.** (2000). Initial enzyme for glycosyl phosphatidyl inositol biosynthesis requires PI3-K and is regulated by DPM2. *EMBO J* 19:4402-4411.
- [29] **Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B.** (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* 328:307-317.
- [30] **Sogíé G, Griscelli-Bennaceur A, Sigaux F, Gluckman E.** Diagnostic immunocytologique et moléculaire des hémoglobinuries paroxystiques nocturnes. *Hématologie* 1995 ; vol. 1, n 1 : 63-65.
- [31] **Motowo Tomita.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1455 Review Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (1999) 269-286.
- [32] **Kajiwara K, Watanabe R, Pichler H, Ihara K, Murakami S, Riezman, HandFunato K.** (2008).Yeast ARV1 Is Required for Efficient Delivery of an Early GPI Intermediate to the First Mannosyltransferase during GPI Assembly and Controls Lipid Flow from the Endoplasmic Reticulum. *molbiol* 19:2069-2082 .

- [33] **Kinoshita T, Fujita M and Maeda Y.** (2008). Biosynthesis, remodeling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: recent progress. *J Biochem.* 144:287-294.
- [34] **M. Bey et Al.** *Archives de Pédiatrie* 2008; 15: p923-p1019.
- [35] **Hong Y, Maeda Y, Watanabe R, Ohishi K, Mishkind M, Riezman H and Kinoshita T.** (1999). Pig-n, a Mammalian Homologue of Yeast Mcd4p, Is Involved in Transferring Phosphoethanolamine to the First Mannose of the Glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem.* 274:35099-35106.
- [36] **R. Peffault de Latour, Z. Amoura, G. Socié.** (2010). Mise au point : L'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *La Revue de Médecine Interne*, Volume 31, Issue 3, Pages 200-207.
- [37] **Kostova Z, Rancour DM, Menon AK, Orlean P.** (2000). "Photoaffinity labelling with P3-(4-azidoanilido) uridine 5'-triphosphate identifies gpi3p as the UDP-GlcNAc-binding subunit of the enzyme that catalyses formation of GlcNAc-phosphatidyl inositol, the first glycolipid intermediate in glycosyl phosphatidyl inositol synthesis." *Biochem J* 350 Pt 3 : 815-822.
- [38] **C.J. Parker.** The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Experimental Hematology* 35 (2007) 523–533.
- [39] **Rosse W.** A brief history of PNH. In: Young NS, Moss J, editors. *PNH and the GPI-linked proteins*. San Diego: Academic Press; 2000. p. 1–20.

- [40] **Udenfriend S, Kodukula K.** (1995). How glycosyl-phosphatidyl-inosito anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem.*64: 563-91.
- [41] **Ray JG, Burows RF, Ginsberg JS, Burrows EA.** (2000). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the risk of venous thrombosis : review and recommendations for management of the pregnant and non pregnant patient. *Haemostasis.* 30 :103-117.
- [42] **Vishwakarma, R.A and Menon, A.K.** (2005).flip-flop of glycosyl phosphotidyl inositols (GPI's) across ER. *chemcommun (camb)* 453-455.
- [43] **Ashida H, Hong Y, Murakami Y, Shishioh N, Sugimoto N, Kim YU, Maeda Y, Kinoshita T.** (2005). Mammalian PIG-X and yeast Pbn1p are the essential components of glycosyl-phosphatidyl-inositol-mannosyltransferase I. *MolBiol Cell.* 16(3): 1439-48.
- [44] **Peffault de Latour R, et al.** L'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Rev Med Interne* (2009), doi: 10.1016/j. revmed 2008. 12 .020.
- [45] **Mawxell M, Richard Lee G.** Hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Hématologie clinique* 1990 ; 8^{ème} édition, vol I p : 1112-1124.
- [46] **De Gramont A.** Hémoglobinurie paroxystique nocturne. Etude clinique et biologique de 142 patients. Thèse méd, Paris, 1982.
- [47] **F.Bulkam.** (2010).Hémoglobinurieparoxystique nocturne.

- [48] **Kruatrachue M, Wasi P, Na-Nakoran S.** Paroxys-special nocturnal haemoglobinuria in Thailand with special reference to an association with aplastic anemia. *Br J Haematol*, 1978, 39 : 267.
- [49] **Dreyfus B.** Hémoglobinurie paroxystique nocturne. *L'hématologie de B. Dreyfus*, Flammarion Méd Sci 1992 ; 58 : 752-62.
- [50] **Takahashi, M., Inoue, N., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N., Endo., Y., Fujita., T., Takaeda., J and Kinoshita, T.** (1996). PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large luminal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. *EMBO J.* 15:4254-4261.
- [51] **Del Rincon I, Yebra M.** Amélioration sous corticothérapie des lésions cutanées de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Presse Méd* 1990 ; 19 : 870.
- [52] **Taillan B, Rodot S, Fuzibet JG.** Lésions cutanées au cours de l'HPN. *Presse Méd* 1989 ; 18 : 1435.
- [53] **Luzzatto L, Bessler M.** (1996). The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol.* 3 :101-10.
- [54] **Y Maeda, R Watanabe, C.L Harris, Y Hong, K Ohishi, K Kinoshita and Taroh Kinoshita.** (2001). PIG-M transfers the first mannose to glycosyl-phosphatidyl-inositol on the luminal side of the ER. *The EMBO J* 20 : 250–261.

- [55] **Shichishima T, Terasawa T, Hashimoto C.** Heterogenous expression of decay accelerating factor and CD59/membrane attack complex inhibitor factor on PNH erythrocytes. *Br J haematol* 1991 ; 78 : 545-50.
- [56] **Dhumeaux D, Bennaceur-Griscelli A, Sogié G, Gluckman E, Rhamouni A.** Prise en charge des patients atteints d'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Hématologie* 1995 ; 1 : 57-60.
- [57] **Sogié G, Gluckman E.** Hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), hématologie* 1997 ; 13006-D25 ; 1997, 4P.
- [58] **Shishioh N, Hong Y, Ohishi K, Ashida H, Maeda Y, Kinoshita T.** (2005). GPI7 is the second partner of PIG-F and involved in modification of glycosyl phosphatidyl inositol. *J Biol Chem.* 280(10) : 9728-34.
- [59] **Hillmen P.** Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *British journal of haematology* 2000 ; 108 ; 470-479.
- [60] **Janssens, G.** (2009). *Répertoire d'analyse de biologie clinique*.P. 14,15.
- [61] **Kang JY, Hong Y, Ashida H, Shishioh N, Murakami Y, Morita YS, Maeda Y, Kinoshita T.** (2005). PIG-V involved in transferring the second mannose in glycosyl phosphatidyl inositol. *J Biol Chem.* 280(10) : 9489-97.

- [62] **Nafa K, Mason PJ, Hillmen P, Luzzatto L, Bessler M.** (1995). Mutations in the PIG-A gene causing paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are mainly of the frameshift type. *Blood* ; 86 : 4650-5.
- [63] **Rosti V, Tremml G, Soares V, Pandolfi PP, Luzzatto L, Bessler M.** (1997). Murine embryonic stem cells without pig-a gene activity are competent for hematopoiesis with the PNH phenotype but not for clonal expansion. *J Clin Invest.* 100 : 1028-36.
- [64] **Gladwin MT, Lancaster JR, Jr.Freeman BA, Schechter A.N.** Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med* 2003 ; 9 : 496-500.
- [65] **Schnog JJ, Jager EH, van der Dijs FP, et al.** Evidence for a metabolic shift of arginine metabolism in sickle cell disease. *Ann Hematol* 2004 ; 83 : 371-375.
- [66] **Hong, Y., Maeda, Y., Watanabe, R., Inoue, N., Ohishi, K., and Kinoshita, T.** (2000). Requirement of PIG-F and PIG-O for transferring phosphoethanolamine to the third mannose in glycosylphosphatidylinositol. *J BiolChem* 275 : 20911-20919.
- [67] **Carmichael FJ, Ali AC, Campbell JA, et al.** A phase I study of oxidized raffinose cross-linked human hemoglobin. *Crit Care Med* 2000 ; 28 : 2283-2292.
- [68] **Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin M.T.** The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin : a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005 ; 293 : 1653-1662.

- [69] **Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L.** (1999). Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96 : 5209-14.
- [70] **Hugel B, Socie G, Vu T, et al.** Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999 ; 93 : 3451-3456.
- [71] **Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims P.J.** Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993 ; 82 : 1192-1196.
- [72] **Cadwell V.** Hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Revue du praticien* 1993 ; 43 : 11.
- [73] **Taron, B.W., Colussi, P.A., Wiedman, J.M., Orlean, P. and Taron, C.H.** (2004). Human Smp3p adds a fourth mannose to yeast and human glycosyl phosphatidyl inositol precursors in vivo. *J. Biol. Chem.* 279 : 36083-36092.
- [74] **S. J. Richards, P.Hillmen.** Advances in the laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clinical and Applied Immunology Reviews* .1 (2001) 315–330.

- [75] **Chen G, Zeng W, Maciejewski JP, Kcyvanfar K, Billings EM, Young NS.** (2005). Differential gene expression in hematopoietic progenitors from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients reveals an apoptosis/immune response in normal phenotype cells. *Leukemia*. 19 : 862-8.
- [76] **P. Gane.** (2002). La cytométrie en flux en immunohématologie. *Transfusion clinique et biologique* ; 9 : 271–279.
- [77] **Parker C, Omine M, Richards S, et al.** (2005). Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*; 106 : 3699-3709.
- [78] **Ohashi H, Hotta T, IchikawaA, KinoshitaT, Taguchi R, KiguchiT, et al.** (1994). Peripheral blood cells are predominantly chimeric of affected and normal cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : simultaneous investigation on clonality and expression of glycoposphatidylinositol-anchored proteins. *Blood*. 83 : 853-9.
- [79] **Cécile Turrel-Cuzin.** 2012. Cytométrie en flux et tri cellulaire :1-2.
- [80] **Wang H, Chuhjo T, Nakao S.** (2003). Clinical of increased PNH type cells in the peripheral blood of patients with aplastic anemia and refractory anemia. In : Omine M, Kinoshita T, eds. *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders: molecular aspects of pathogenesis*. P. 129-138.

- [81] **Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao S.** (2002). Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuriantype cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 100 :3897-3902.
- [82] **Zagdanski AM, Guermazi A, De Kerviler E.** Imagerie dans la pathologie du globule rouge. *Encycl Méd Chir (Elsevier Paris). Hématologie ; 13-000-N-54 ;1996, 2P.*
- [83] **Kawagoe K, Kitamura D, Okabe M, Taniuchi I, IkawaM,Watanabe T, et al.**(1996). Glycosylphosphatidyl inositol-anchor-deficient mice : implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 87 :3600-6.
- [84] **R. Azoulay et al.** Imagerie des thromboses portales. *EMC-Radiologie 1* (2004) 470–490.
- [85] **Habibi B.** Hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Encycl Méd Chir. Sang* 1988 ; 13006 D25 ; 4P.
- [86] **Rio B.** Hémoglobinurie paroxystique nocturne. *La revue du praticien* 1997 ; 47.
- [87] **Sogié G, Mary JY, De Gramont A et al.** For the french society of hematology. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria : long-term follow-up and prognostic factors. *Lancet* 1996 ; 348 ; 573-577.

- [88] **MD Marra, MD Crema, M Raynal, E Bridel, JM Tubiana et L Arrivé.** Syndrome de Budd-Chiari compliquant une hémoglobinurie paroxystique nocturne. *J Radiol* 2008 ; 89 : 594-5.
- [89] **Prince GM, Nguyen M, Lazarus HM, Brodsky RA, Terstappen LW, Medof ME.** (1995). Peripheral blood harvest of unaffected CD34+ CD38- hematopoietic precursors in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 86 : 3381-6.
- [90] **Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV.** Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995 ; 333 : 1253-8.
- [91] **Grossman JA, Mc Dermott WV JR.** Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria associated with hepatic and portal venous thrombosis. *Ame J Surgery* 1974 ; 127 (6) : 733-6.
- [92] **Hartman RC, Luther AB, Jenkins JR.** Fulminant hepatic venous thrombosis (Budd-Chiari syndrome) in PNH : definition of a medical emergency. *Johns Hopkins Med J* 1980 ; 146 : 247-9.
- [93] **Rafalowska J, Dziewulska D, Szyluk B.** Morphological picture in PNH. Case report. *Folia neuropathol* 1994 ; 32 (3) : 161-6.
- [94] **Valla D, Dhumeaux D, Babany G et al.** Hepatic vein thrombosis in PNH. A spectrum from asymptomatic occlusion of hepatic venules to fatal Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* 1987 ; 93 (3) : 569-75.

- [95] **Draeos ZK, Hansen RC.** Hemorrhagic bullae in an anemic women. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH). Archives of dermatology 1986 ; 122 (11) : 1326-7, 1329-30.
- [96] **Rosse WF.** PNH as a molecular disease. Medicine 1997 ; 76 (2) : 63-93.
- [97] **Rietschel RL, Lewis CW, Simmons RA.** Skins lesions in PNH. Archives of dermatology 1978 ; 114 (4) : 560-3.
- [98] **Nakakuma H, Hidaka M, Nagakura S.** Expression of cryptantigen Th on PNH erythrocytes in association with an hemolytic exacerbation. J Clin Invest 1995 ; 96 : 201-6.
- [99] **Najman A.** Les anémies hémolytiques acquises. Hématologie tome 1. Editions marketing 1994 ; 23 : 383-90.
- [100] **Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, Brodsky RA, Bell L.** Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Nat Biotechnol 2007 ; 11 : 1256–64.
- [101] **Rother R et al.** (2007). Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Nature Biotechnol ; 25 : 1256-1263.
- [102] **Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socié G, Muus P, et al.** The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. N Engl J Med 2006 ; 355 : 1233-43.

- [103] **Hillmen P, Muus P, Dührsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, et al.** Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007 ; 110 : 4123-8.
- [104] **Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, et al.** Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 552-9.
- [105] **Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, et al.** Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2008 ; 111 : 1840-7.
- [106] **Peffault de Latour R, Socié G.** L'hémoglobinurie paroxystique nocturne 2007.
- [107] **Krauss JS.** Laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Clin Lab Sci* 2003 ; 33 : 401-6.
- [108] **Berthou C.** (2006). Conduite à tenir devant Une bi ou pancytopénie.
- [109] **Socie G, Mary JY, de Gramont A, Rio B, Leporrier M, Rose C, et al.** Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria : long-term follow-up and prognostic factors. French society of haematology. *Lancet* 1996 ; 348 : 573-7.

- [110] **Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, et al.** (2007). Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*.110 : 4123-8.
- [111] **Hall C, Richards S, Hillmen P.** Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2003 ; 102 : 3587-91.
- [112] **C. Parker, M. Omine, S. Richards, J.I. Nishimura, M. Bessler, R.Ware, P. Hillmen, L. Luzzatto, N. Young, T. Kinoshita, W. Rosse, G. Socie.** Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Blood* (2005) 3699-3709.
- [113] **Godeau P, Herson S, Piette JC.** Maladie de MARCHIAFAVA6MICHELI (HPN). *Traité de médecine. Med-Sci Flammarion* 1996 ; 2521.
- [114] **Balleari E, Gatti AM, Marenzi C.** Recombinant human erythropoietin for long-term treatment of anemia in PNH. *Haematologica* 1996 ; 81 (2) : 143-7.
- [115] **G. Socié, G. Bagou.** (2008). Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne. ORPHA447.
- [116] **Tichelli A, Socie G, Marsh J, et al.** (2002). Outcome of pregnancy and disease course among women with aplastic anemia treated with immunosuppression. *Ann Intern Med.* 137 : 164-172.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.

- *Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*
- *Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*
- *Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*
- *Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*
- *Les médecins seront mes frères.*
- *Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*
- *Je maintiendrai le respect de la vie humaine dès la conception.*
- *Même sous la menace, je n'userai pas de mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*
- *Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

قسم أبقراط

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضوا في المهنة الطبية أتعهد علانية:

- أنا أكرس حياتي لخدمة الإنسانية .
- وأن أحترم أساتذتي وأعترف لهم بالجميل الذي يستحقونه .
- وأن أمارس مهنتي بوانزع من ضميري وشر في جاع علاصحة مريض هدي في الأول .
- وأن لا أفشي الأسرار المعهودة إلي .
- وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب .
- وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي .
- وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي .
- وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها .
- وأن لا أستعمل معلوماتي الطبية بطريق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد .
- بكل هذا أتعهد عن كامل اختيار ومقسما بالله .

والله على ما أقول شهيد .

جامعة محمد الخامس - الرباط
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 20

سنة : 2018

**الهيموغلوبينية الانتيابية
الليالية تحت الإكلينيكي:
مساهمة التدفق الخلوي**

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرفه

السيد: جعفر فومتيزي

المزداد في 26 يناير 1993 بالرباط

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات الأساسية: الهيموغلوبينية الانتيابية الليالية - تدفق الخلوي اللاتسجي -
CD 59 - CD 55 - الجين والبروتين GPI.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: عبد الله دامي

أستاذ في الكيمياء الحيوية

مشرف

السيد: عز العرب مسرار

أستاذ في علم الدم البيولوجي

السيدة: منى نزيه

أعضاء

أستاذة في علم الدم البيولوجي

السيدة: سعاد بنكيران

أستاذة في علم الدم البيولوجي