

**Profils phénotypiques et évolutifs des tailles des clones de
l'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne
dans les Aplasies Médullaires**

**S.Oukid, S.Taoussi, N. Rekab, F. Lamraoui, C. Boucherit, Y. Bouchakor, M. K. Benlabiod,
H. Brahimi, M. Mezroud, C. Guezlane, M. T. Abad, M. Bradai.**

Service Hématologie, EHS ELCC. CAC Blida

14^{ème} congrès National d'Hématologie, Constantine Octobre 2017

□ Introduction

Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne (HPN) ou Maladie de Marchiafava - Micheli est (1) :

- Une maladie rare, acquise et chronique.
- Liée à l'expansion clonale d'une ou de plusieurs cellules souches hématopoïétiques.
- Due à une mutation acquise du gène **PIG-A**, localisée sur le bras court du chromosome X (Xp22).
- Il en résulte un blocage de la synthèse des molécules d'ancrage de glycosyl-phosphatidyl-inositol (**GPI**), responsables de la fixation de nombreuses protéines à la surface cellulaire.

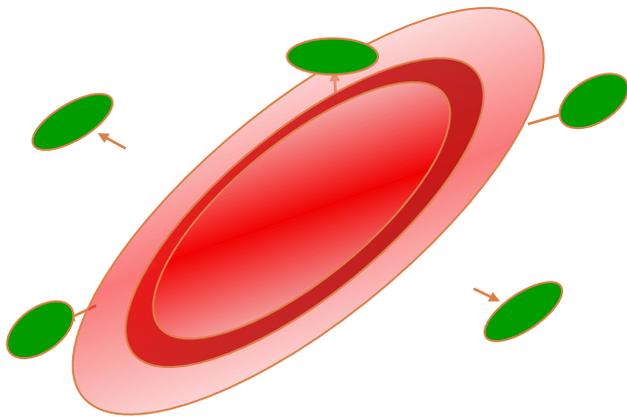
□ Introduction

- Parmi ces molécules dites GPI dépendantes, on a :
 - **CD 55 (DAF) : Decay Accelerating Factor** : contrôle la cascade du complément en régulant l'activité des enzymes C3 et C5 convertases
 - **CD 59 (MIRL) : Membrane Inhibitor of Reactive Lysis** : inhibe la partie terminale de la cascade du complément en inhibant l'incorporation du C9 dans le complexe C5b-8, empêchant la formation CAM ou C5b-9.
- Le CD59 et le CD55 sont des protéines inhibitrices du complément, empêchant normalement l'assemblage final du complexe d'attaque membranaire (CAM).
- L'HPN est la conséquence d'un déficit d'ancrage membranaire de ces deux protéines, qui se manifeste sur le plan clinique par une hémolyse intravasculaire.

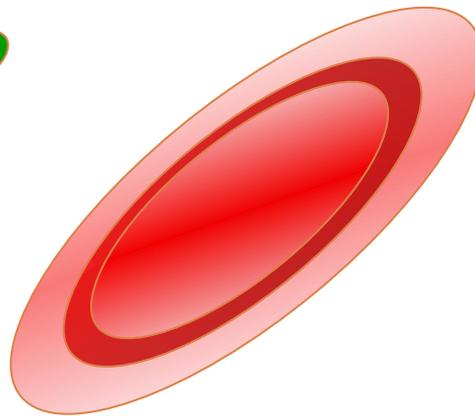
Introduction

Selon le déficit en molécules GPI, on distingue :

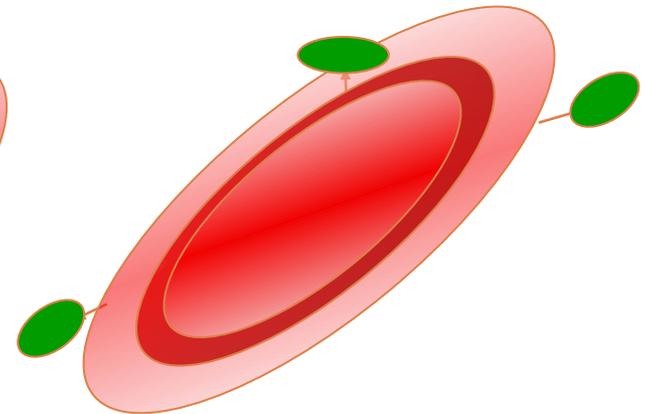
- * Les cellules avec expression normale (**type I**).
- * Les cellules partiellement déficientes (**type II**).
- * Les cellules entièrement déficientes (**type III**).



Type I



Type III



Type II

□ Introduction

➤ **Présentation clinique** est polymorphe :

- Tableau d'hémolyse.
- Tableau d'aplasie médullaire.
- Thrombose.

➤ **Diagnostic** : repose sur la cytométrie en flux depuis 1996 :

- **Haute sensibilité.**
- **Haute spécificité.**

➤ **Expression du clone HPN dans les aplasies médullaires** :

Selon les différentes études :

- 30 à 40% des AM auront un clone HPN soit au diagnostic ou durant l'évolution.(2).
- 20% des AM sévères évolueront vers une HPN classique hémolytique. (2).

Etude

Nous rapportons 118 observations d'AM où le clone HPN a été recherché par cytométrie de flux (CMF) au service d'hématologie CAC Blida soit :

- Au moment du diagnostic de l'AM.**
- Au cours de l'évolution.**

 **Plusieurs manipulations par patient.**

☐ Matériels et méthodes :

Etude prospective ouverte ayant démarré en Août 2009.

L'analyse comprend :

- ✓ **Etude clinique.**
- ✓ **Etude biologique.**
- ✓ **Etude cytologique.**
- ✓ **Test d'Ham Dacie réalisé dans 04 cas.**
- ✓ **Immunophénotypage par CMF à la recherche du clone d'HPN.**

❑ Méthodes de marquage des cellules (CMF) :

*** Prélèvement veineux de sang total frais sur EDTA :**

➤ Patient.

➤ Témoin.

*** Hémogramme.**

*** Quelle population cellulaire cibler?**

❑ Méthodes de marquage des cellules (CMF) :

*** Prélèvement veineux de sang total frais sur EDTA :**

➤ Patient.

➤ Témoin.

*** Hémogramme.**

*** Quelle population cellulaire cibler?**

- Les Polynucléaires Neutrophiles (PNN).

- Les Monocytes (Mono).

- Les globules rouges.

❑ Méthodes de marquage des cellules (CMF) :

* Prélèvement veineux de sang total frais sur EDTA :

➤ Patient.

➤ Témoin.

* Hémogramme.

* Quelle population cellulaire cibler?

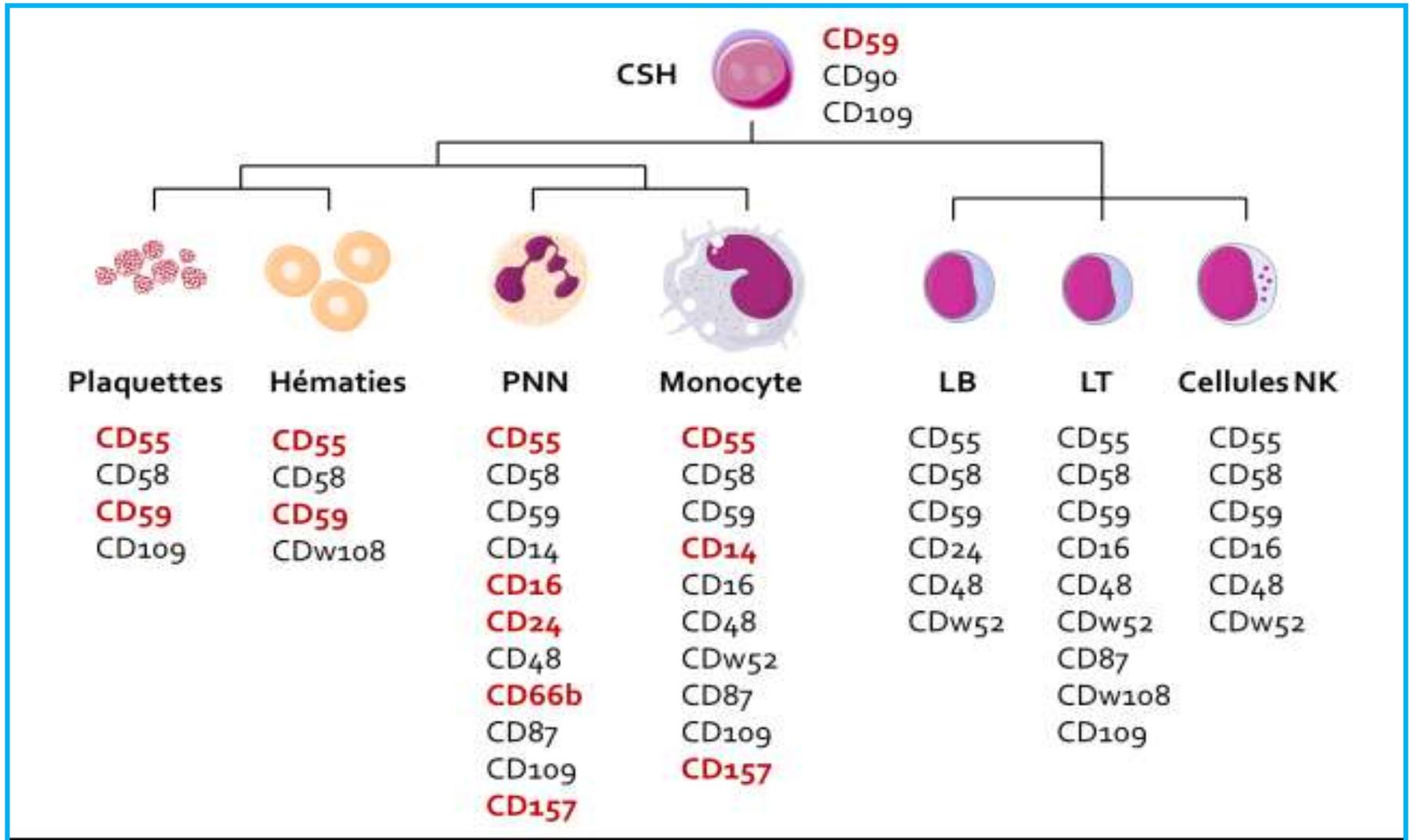
- Les Polynucléaires Neutrophiles (PNN).

- Les Monocytes (Mono).

- Les globules rouges.

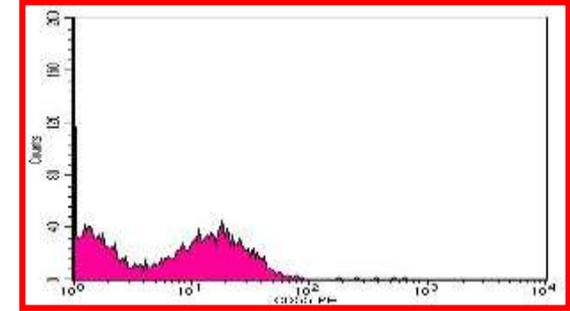
- Quantification précise de la taille du clone .
- Non affectée par les transfusions .

❖ Quelles sont les protéines GPI ancrées à cibler?



❖ Quelles sont les protéines GPI à cibler sur les globules rouges?

➤ Premières méthodes : Analyse du CD55 CD59



- Expression par toutes les cellules hématopoïétiques.
- Taux élevés des faux positifs et faux négatifs avec le CD55.

➤ Intérêt du CD59a : Recommandation du clone MEM43 ou OV9A2

- Meilleure distinction du clone.
- Meilleures résultats.

(Sutherland DR et al. Cytometry part B2012).

➤ Analyse des globules rouges :

- Sous-estimation de la taille du clone (hémolyse , transfusions).

❖ Quelles sont les protéines GPI à cibler sur les PNN?

➤ **Premières analyses** : CD55 et CD59.

➤ **Flaer** : Fluorescently Labeled AERolysine

- Toxine bactérienne fixant spécifiquement les ponts GPI.
- Couplé à fluorochrome AF488.
- Expression par leucocytes.
- Absence d'expression sur les GR.

➤ **Actuellement le Flaer et le CD24.**

➤ **Gating des PNN CD15+.**

❖ Quelles sont les protéines GPI à cibler sur les monocytes?

➤ **CD14.**

➤ **Flaer.**

➤ **Gating des monocytes CD64+.**

❖ **Quelles sont les protéines GPI à cibler sur les PNN?**

➤ **Premières analyses : CD55 et CD59.**

Flaer: marqueur incontournable

➤ **Actuellement le Flaer et le CD24.**

➤ **Gating des PNN CD15+.**

❖ **Quelles sont les protéines GPI à cibler sur les monocytes?**

➤ **CD14.**

➤ **Flaer.**

➤ **Gating des monocytes CD64+.**

❖ Les recommandations internationales d'interprétation

- Perte simultanée (totale ou partielle) d'au moins 2 marqueurs GPI-liés.
- Sur au moins 2 populations cellulaires circulantes.
- **En pratique :** Le diagnostic d'HPN est retenu lors de la détection de plus de 5% des cellules déficitaires sur au moins deux lignées.
- **Une surveillance** par CMF est indiquée en cas :
 - Absence de déficit.
 - Un déficit très modéré ou touchant une seule lignée.

❑ Malades

- Le clone HPN est recherché chez 252 patients.**
- 118 cas sont des Aplasies Médullaires (46,8%).**

❑ Malades

AM : 118 cas.

➤ **Sexe** : Femmes : 64 cas.

Hommes : 54 cas.

Sex ratio (H/F) = 0.84

➤ **Age moyen** = 35,5 ans (15 - 79).

➤ **Délai moyen de DC de l'AM** = 4,3 mois (7 jours - 36 mois).

❑ Malades

AM : 118 cas.

➤ Les motifs de consultations :

- ✓ **Anémie : 53%**
- ✓ **Hémorragie : 34%.**
- ✓ **Infection : 4%.**
- ✓ **Signes d'insuffisance sanguine : 5%.**
- ✓ **Fortuite : 5%.**
- ✓ **Anémie sur grossesse : 04 cas .**
- ✓ **Thrombose : 02 cas.**

❑ Malades

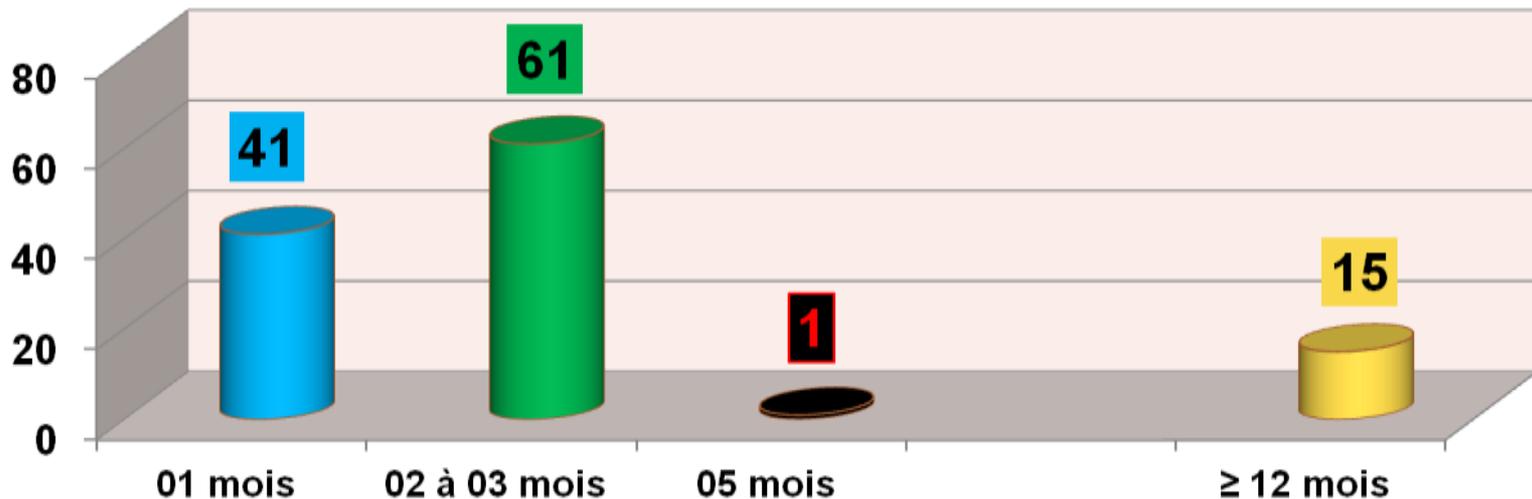
AM : 118 cas.

- **Ponction biopsique osseuse** : a confirmé l'AM dans 100%.
- **Classification de Camitta** :
 - ✓ Modérée : 74 cas (62,7%).
 - ✓ Sévère : 44 cas (37,3%).

❑ Malades

➤ Délai moyen écoulé pour assurer l'immunophénotypage par CMF pour le diagnostique d'HPN : **10 mois (01 - 196)**.

- Délai \leq 01 mois : 41 cas (34.7%).
- Délai entre 2 à 3 mois : 61 cas(51.7%).
- Délai $>$ 12 mois : 15 cas (12.7%).



❑ Résultats de la CMF

- ✓ Absence de clone HPN : 91 cas (77.2%).**
- ✓ Présence de clone HPN : 27 cas (22.8%).**

□ Analyse des HPN : 27 cas

✓ **Sexe : Hommes** : 14 cas.

Femmes : 13 cas. **Sex ratio (H/F) = 1.07**

✓ **Age moyen** = 41 ans (18 - 73).

✓ **Classification de Camitta :**

- **Modérée** : 18 cas (67%).

- **Sévère** : 09 cas (33%).

✓ **Les circonstances ayant accompagnées AM :**

- **Grossesse** : 02 cas.

- **Thrombose** : 03 cas.

- **Signes d'hémolyse** : 10 cas.

❑ Résultats de la CMF

Le type de déficit en molécules GPI :

- ❖ **Partiel (II)** : 02 cas (7.4%).
- ❖ **Total (III)** : 20 cas (74%).
- ❖ **Mixte (II+III)** : 05 cas (18.6%).

❑ Analyse des globules rouges

- Effectuée dans les 27 cas.
- Présence d'un déficit : 20 cas (74%).
- Degré moyen du déficit du CD59 = 27.29% (6 - 82).
- Déficit de moins de 20% = 13 cas (**65%**).

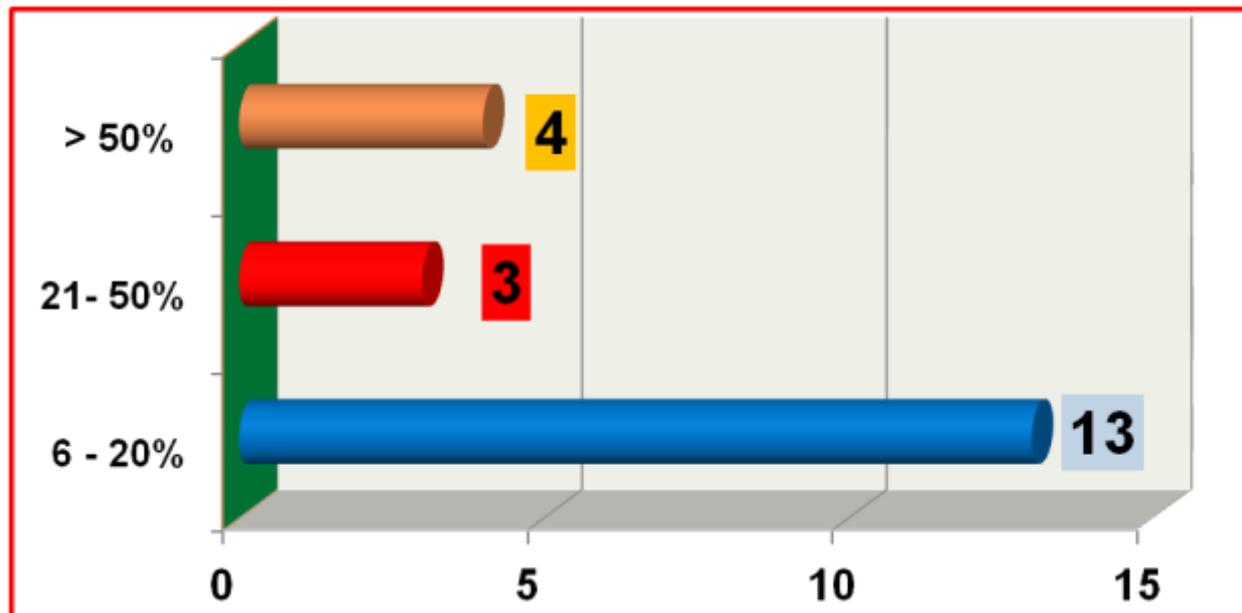


Illustration : Analyse des globules rouges

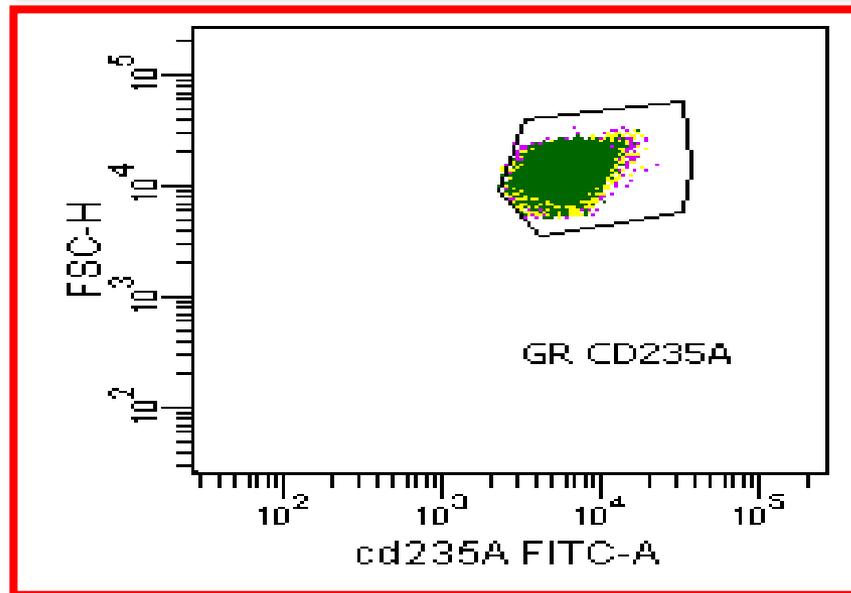
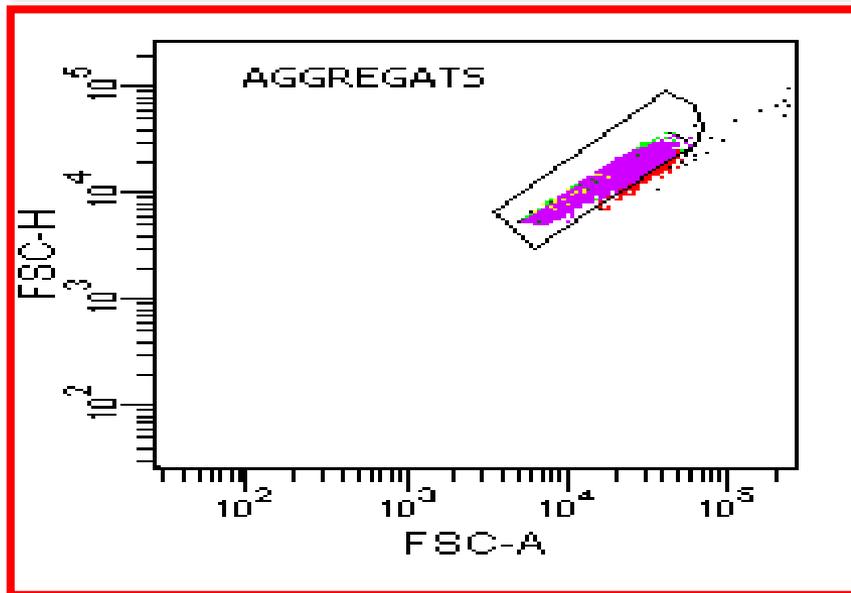
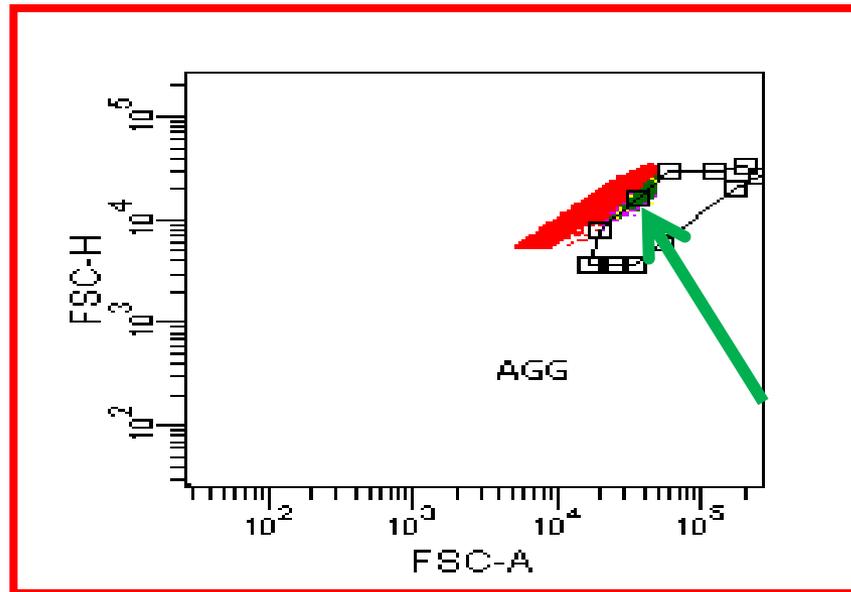
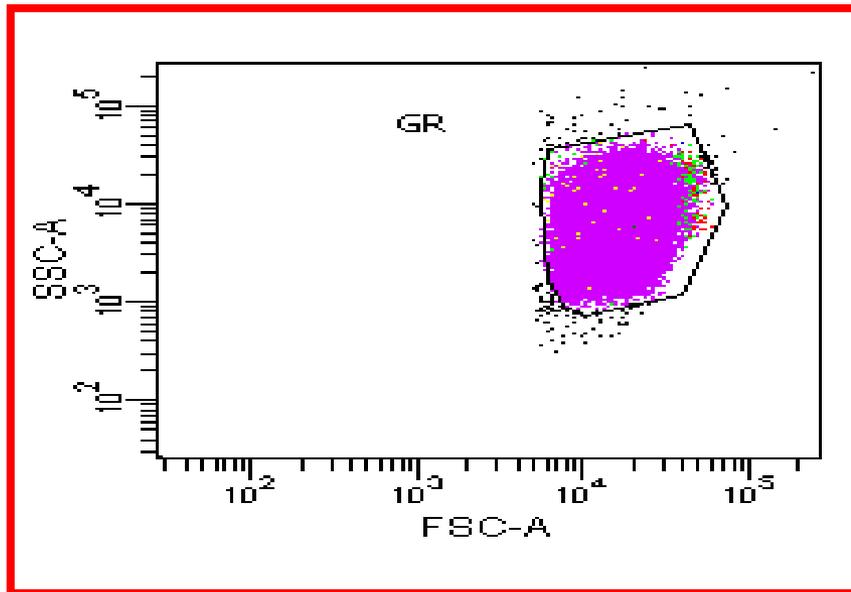


Illustration : Analyse des globules rouges

Témoin normal : Absence de déficit de CD59a

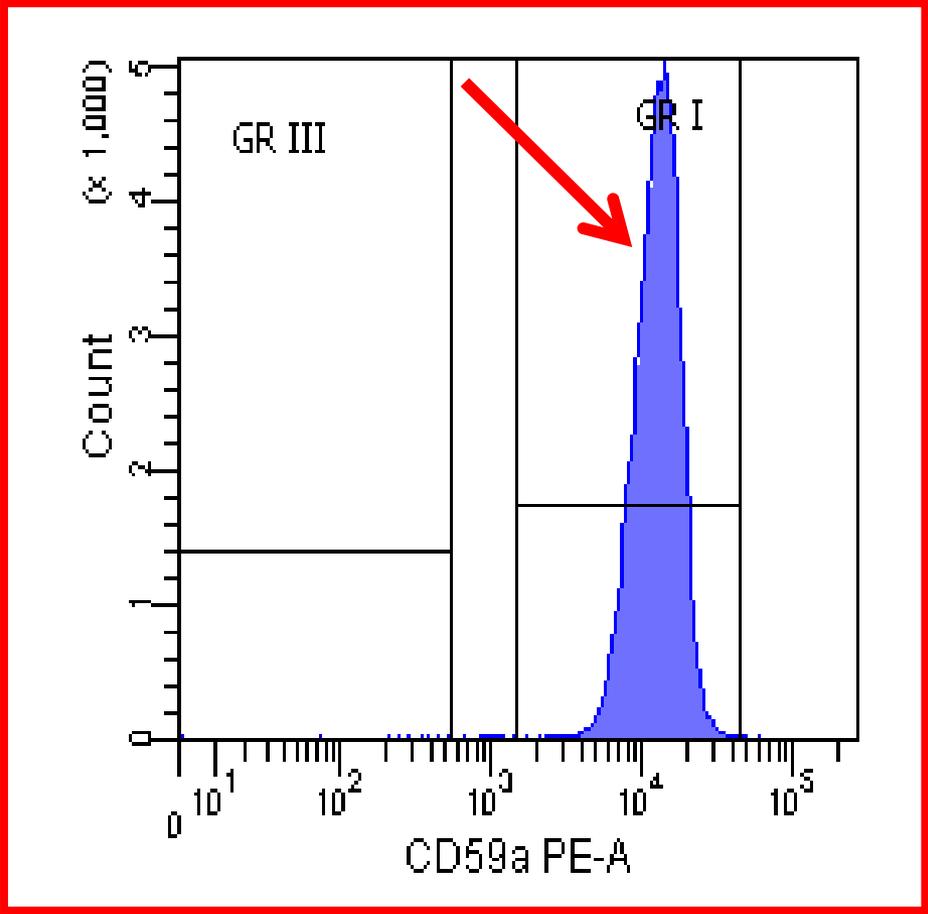
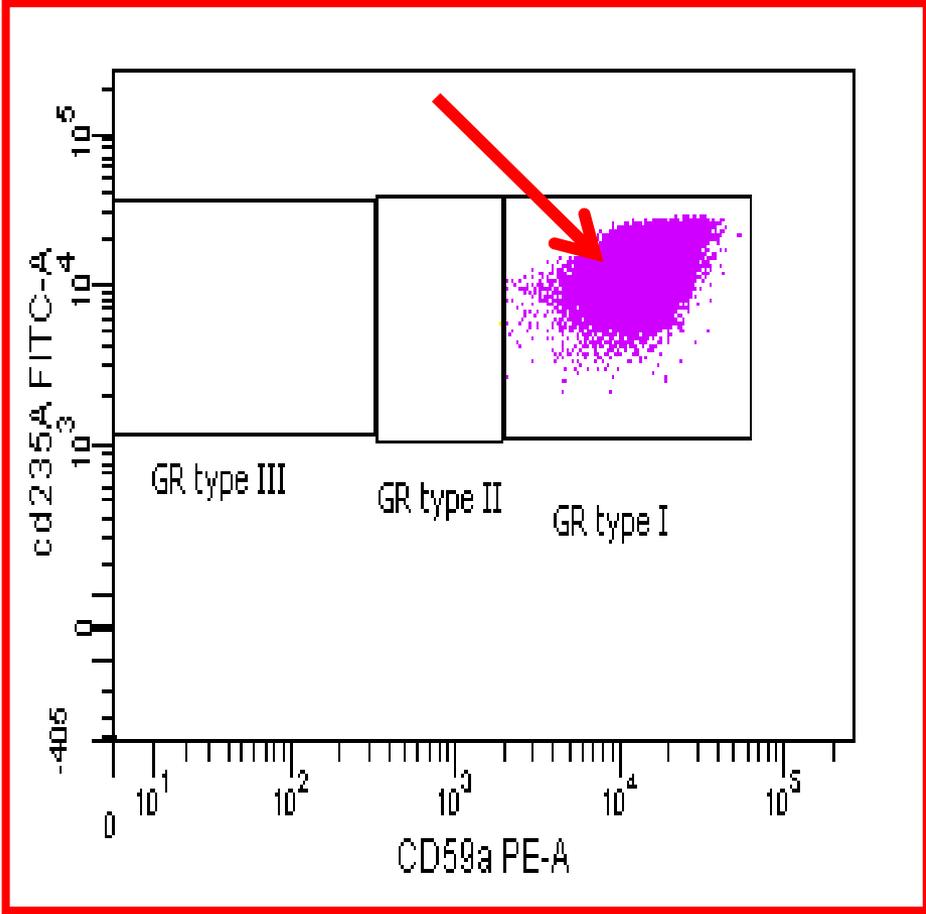
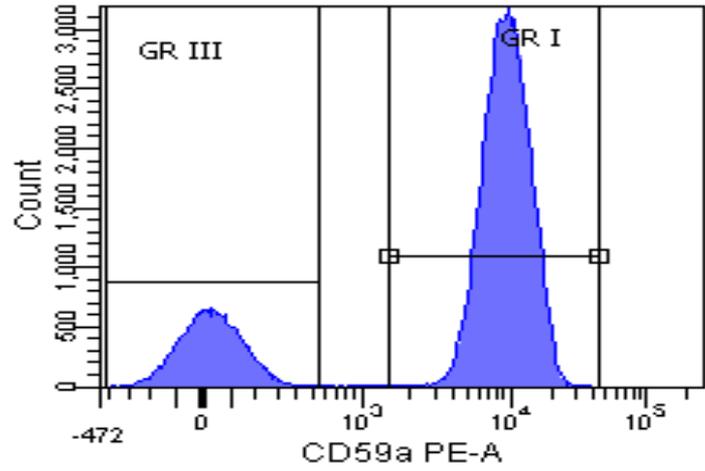
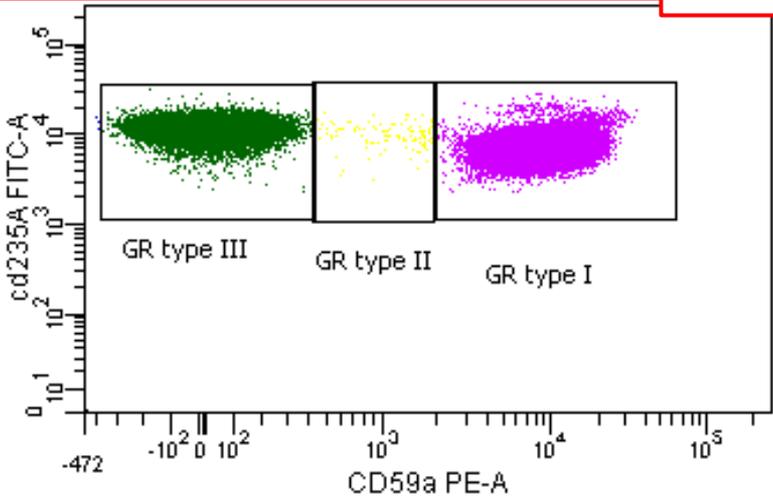
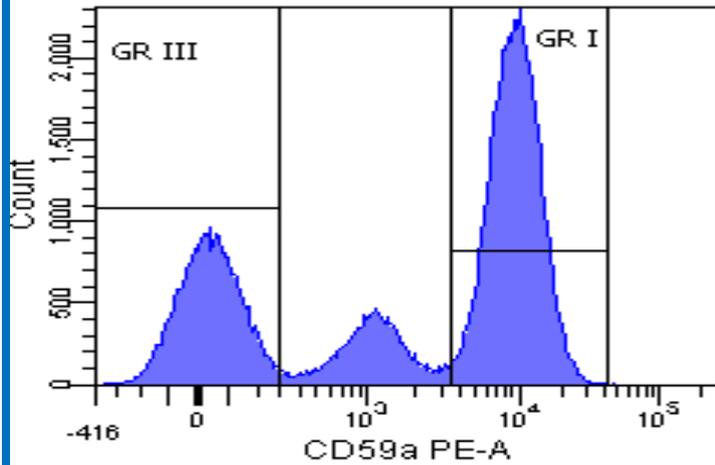
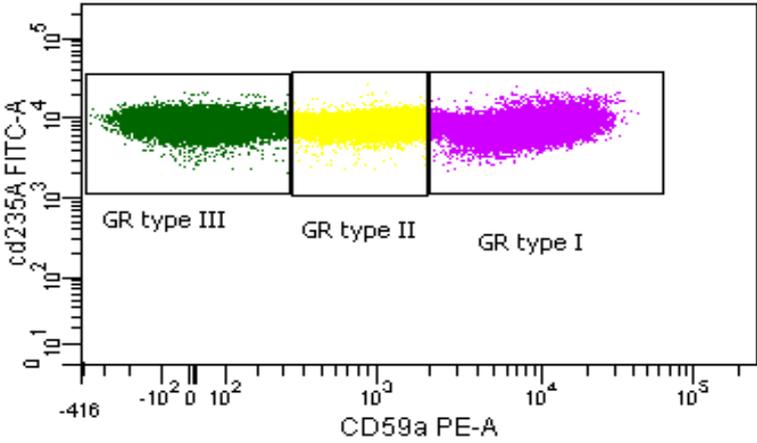


Illustration : Déficit sur les globules rouges

Déficit type III



Déficit Mixte



❑ Analyse des polynucléaires neutrophiles

- Effectuée dans les 27 cas.
- **CD59** : 25 cas. Degré moyen du déficit = 38.22% (5 – 97).
- **Flaer** : 18 cas. Degré moyen du déficit = 55% (7.4 - 99.5%).

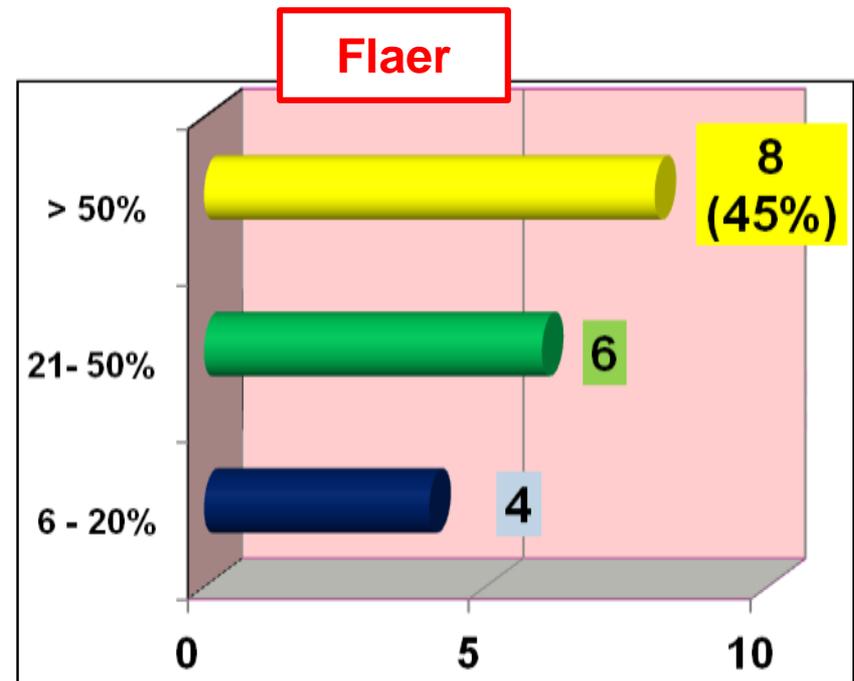
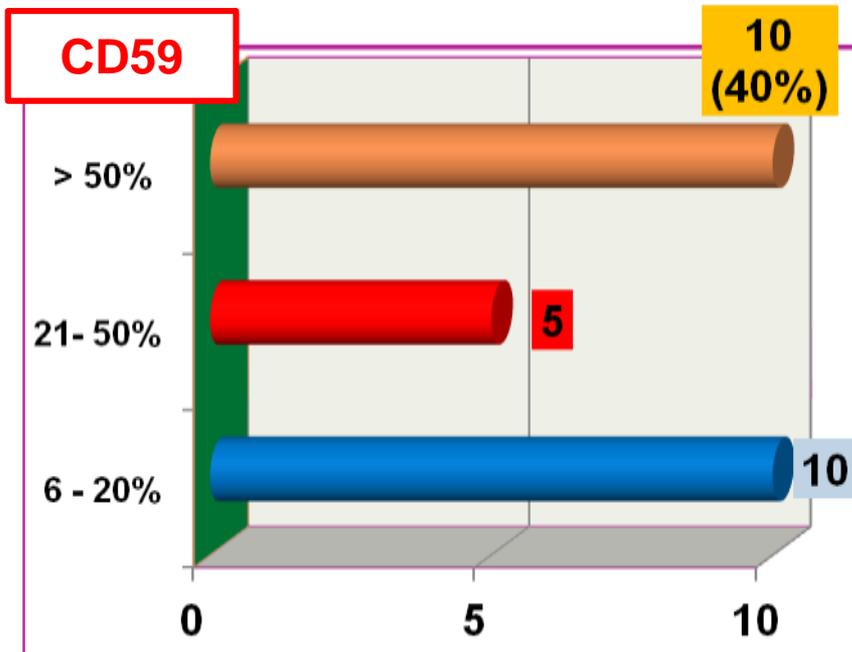


Illustration : Déficit sur les polynucléaires neutrophiles

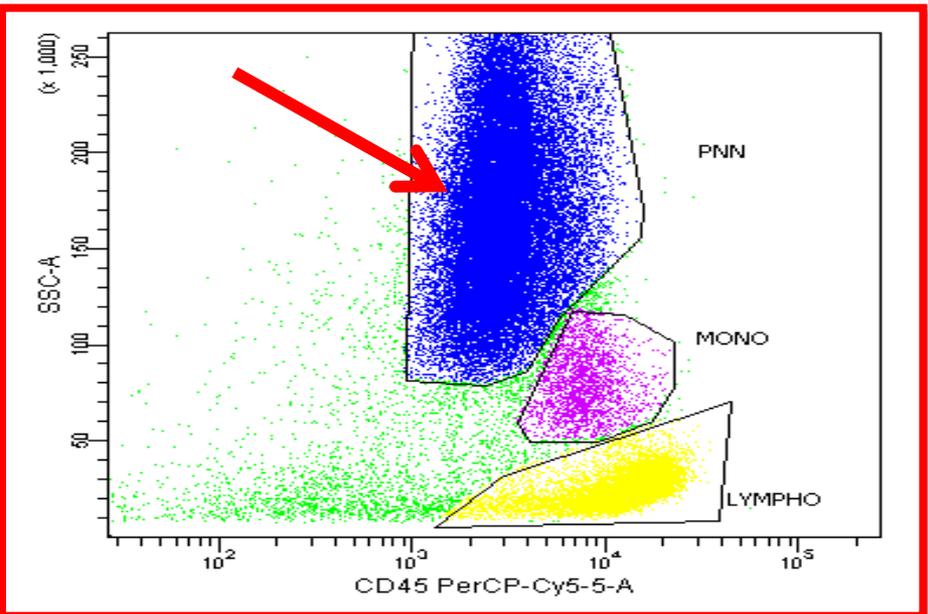
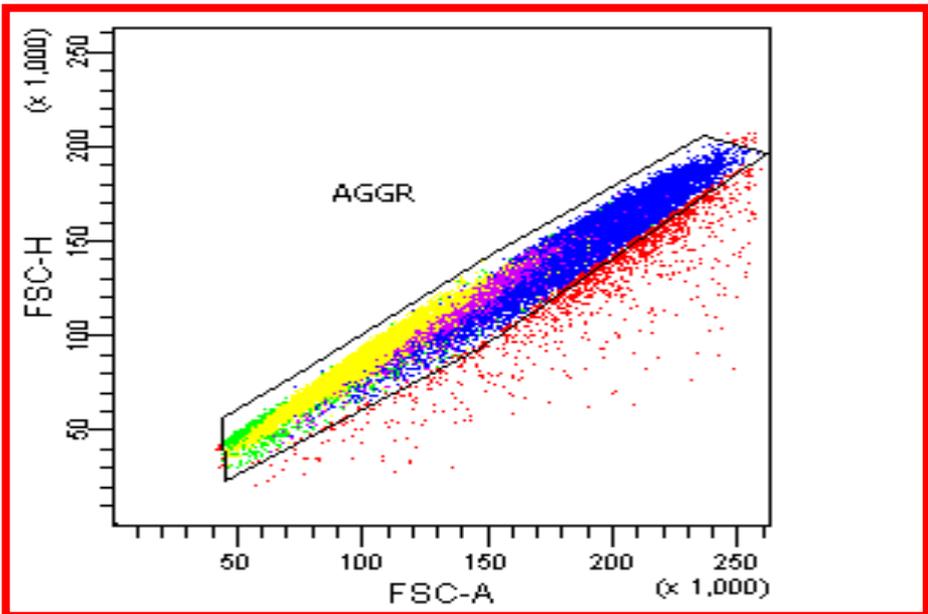
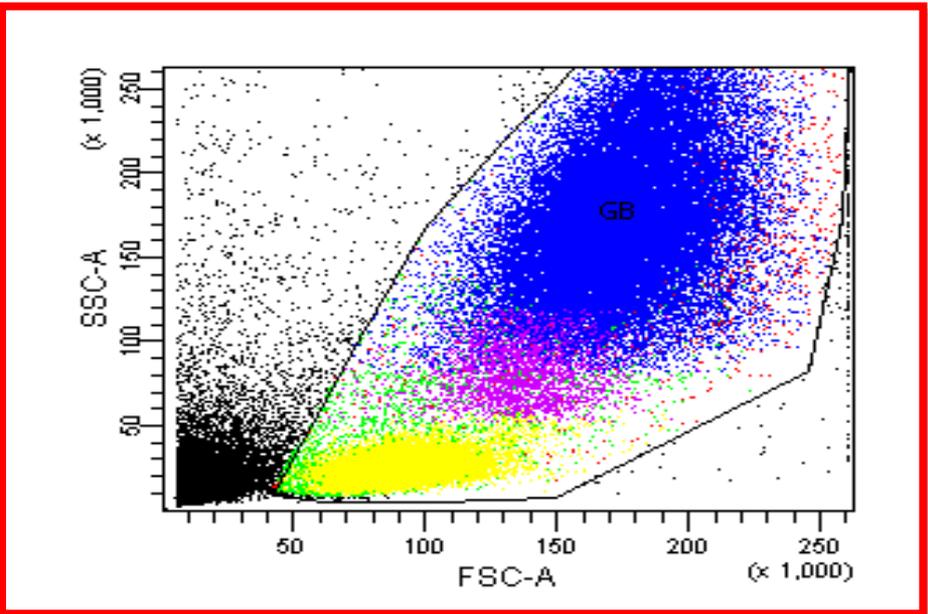
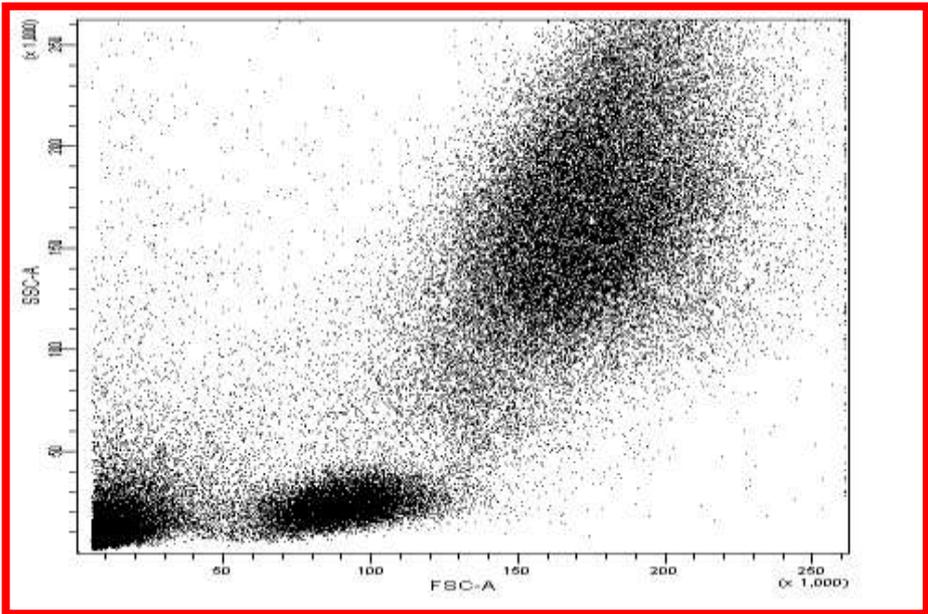
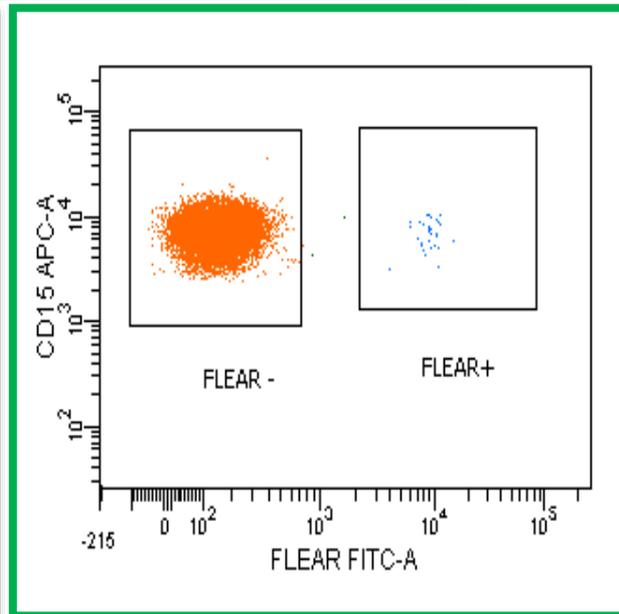
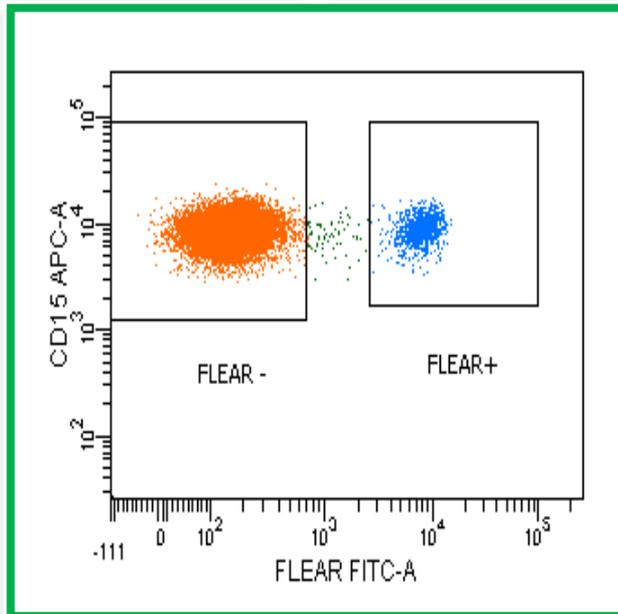
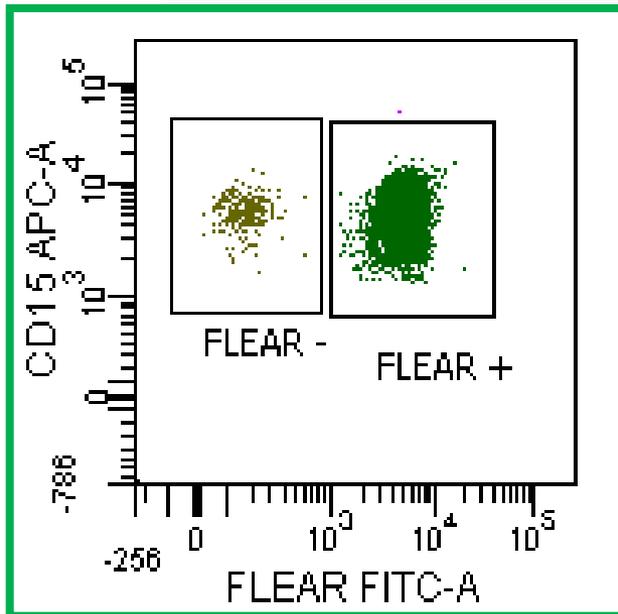
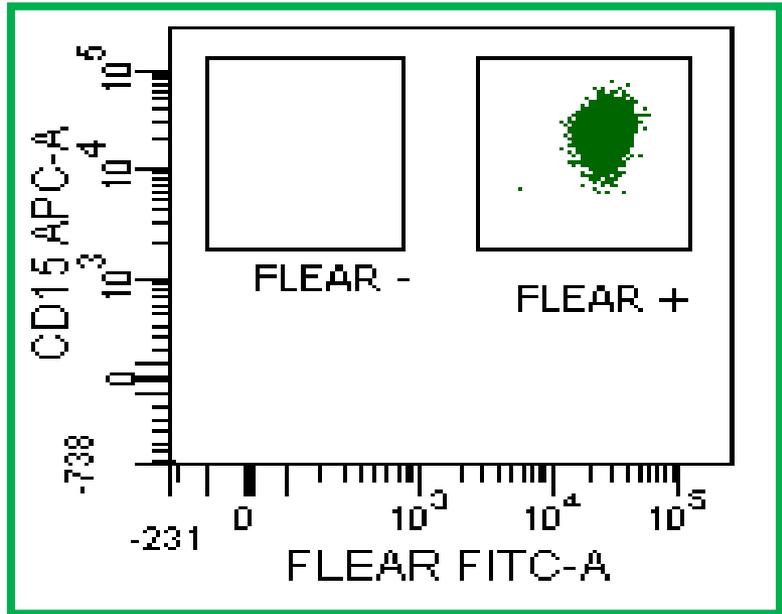
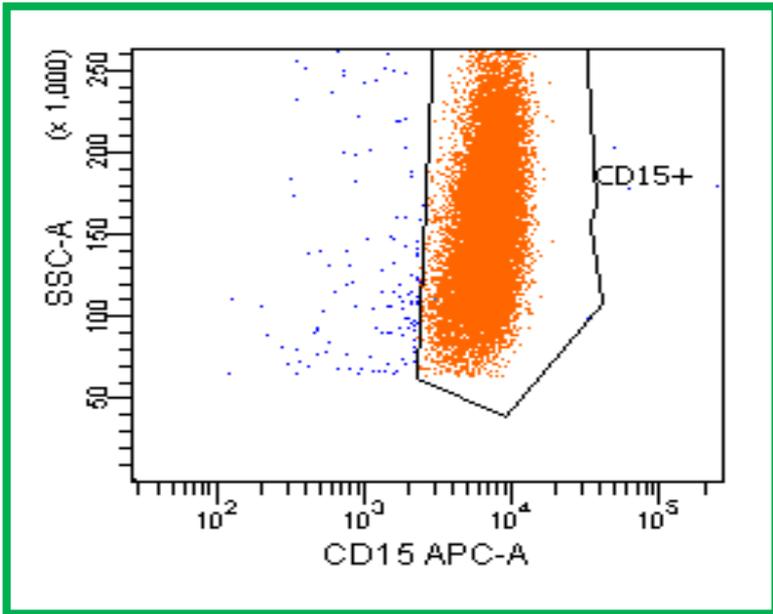


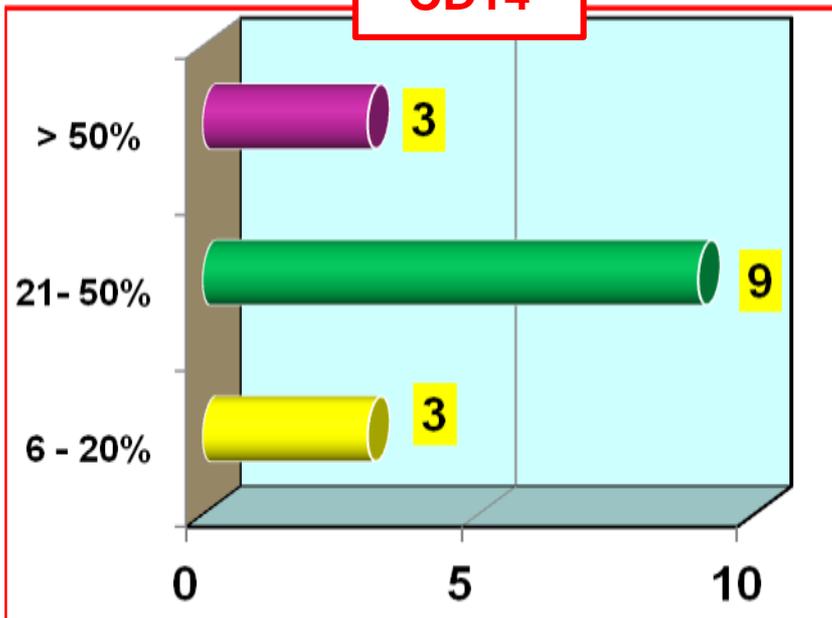
Illustration : Déficit sur les polynucléaires neutrophiles



□ Analyse des monocytes

- Effectuée dans 16 cas.
- **CD14** : 15 cas. Degré moyen du déficit = 41% (7 - 96).
- **Flaer** : 11 cas. Degré moyen du déficit = 55% (12,9 - 93,5).

CD14



FLAER

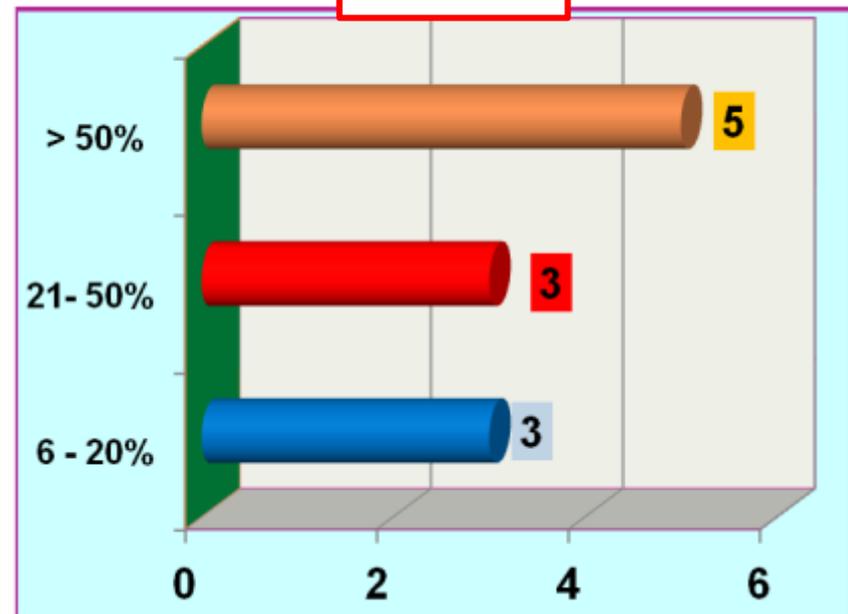


Illustration : Déficit sur les monocytes

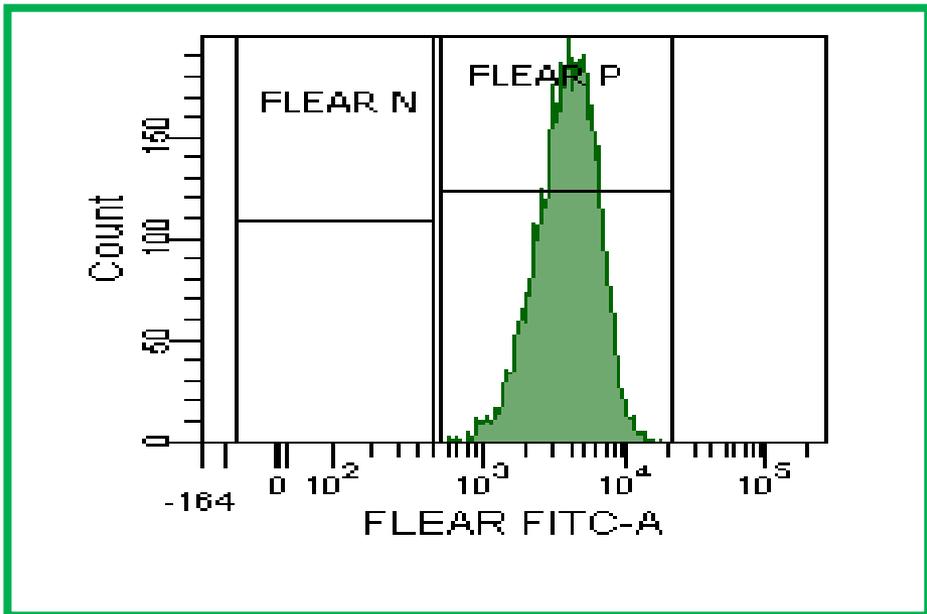
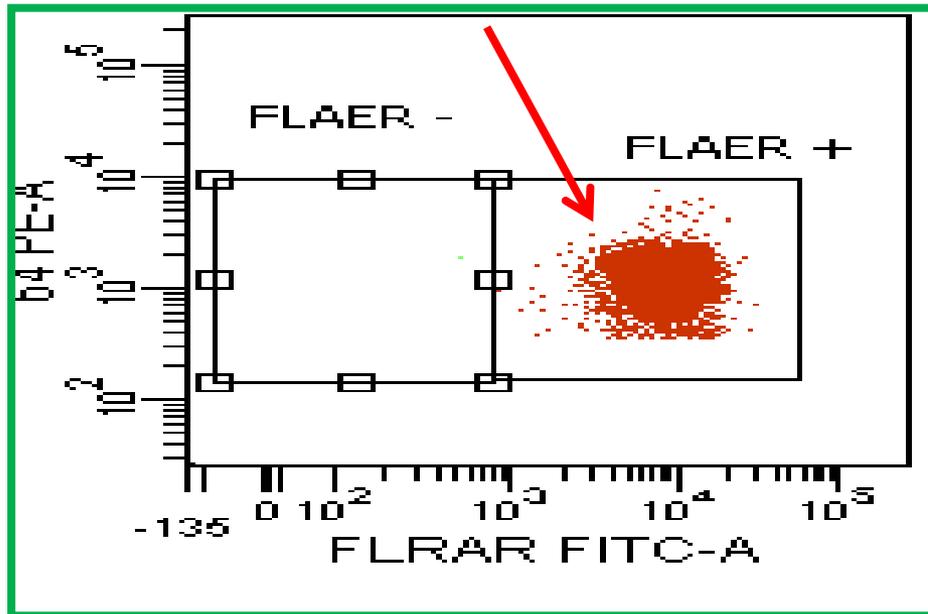
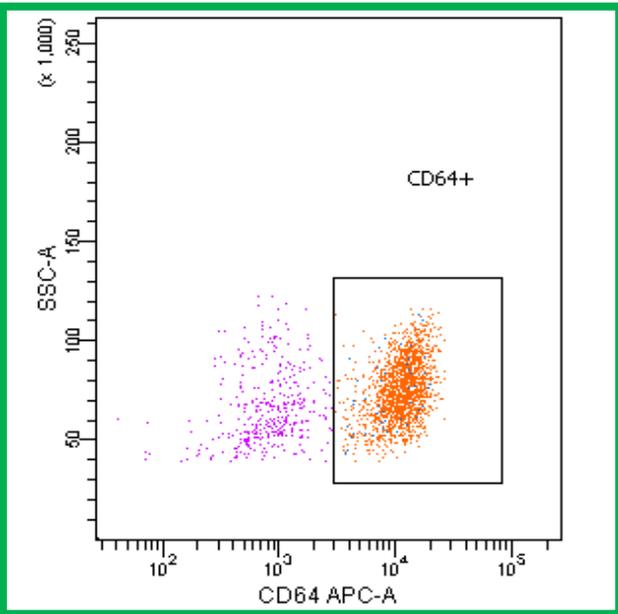
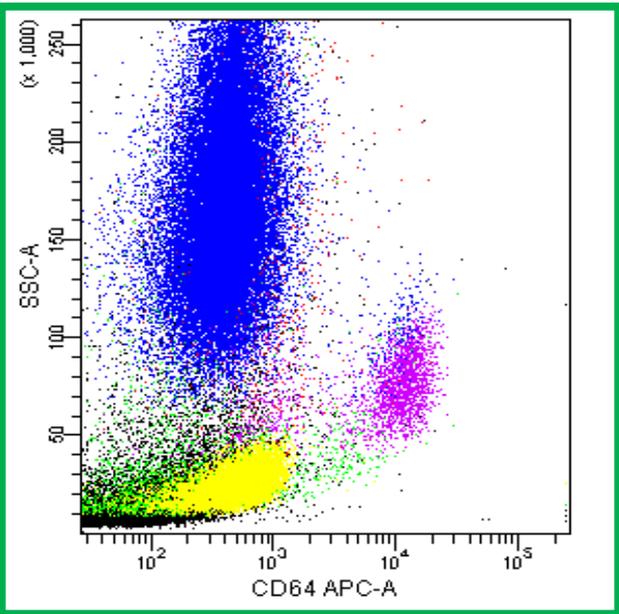
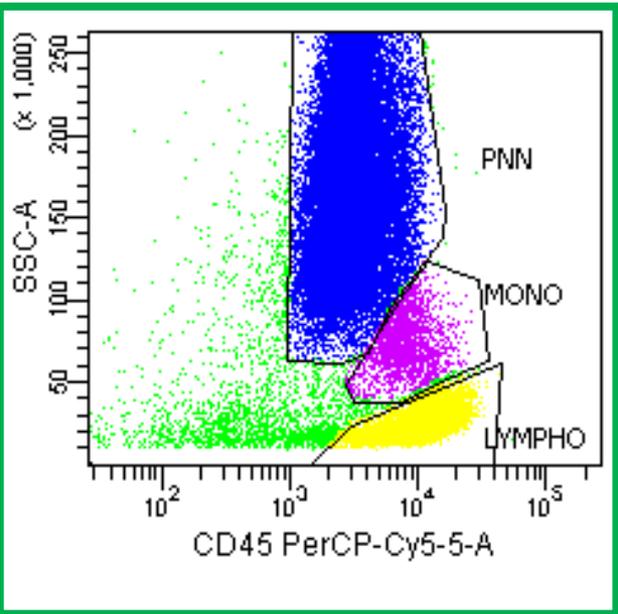
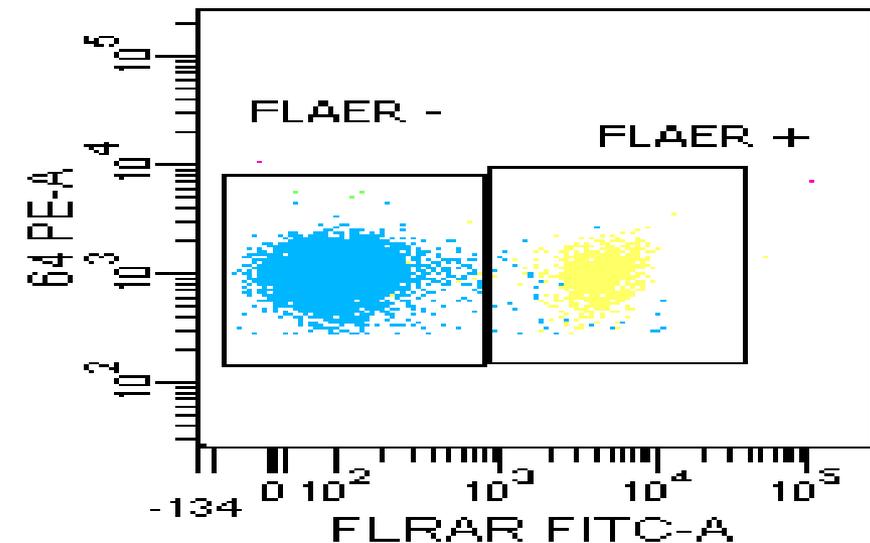
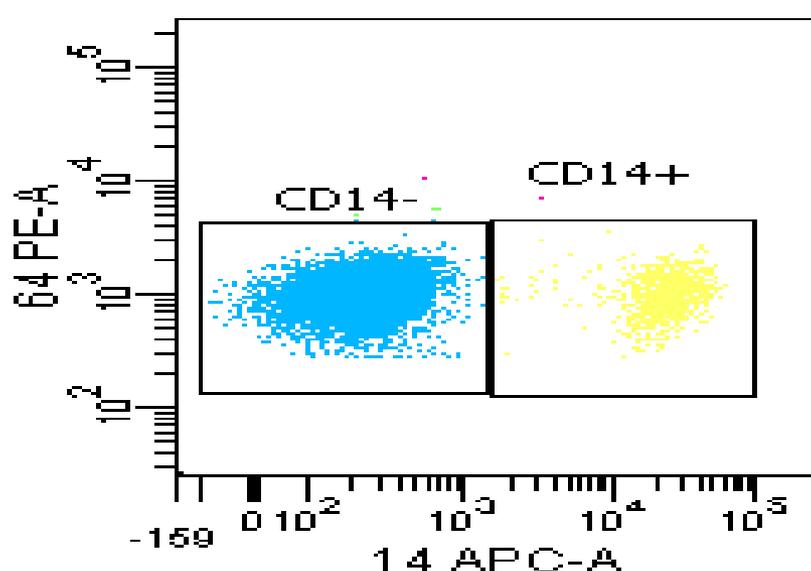
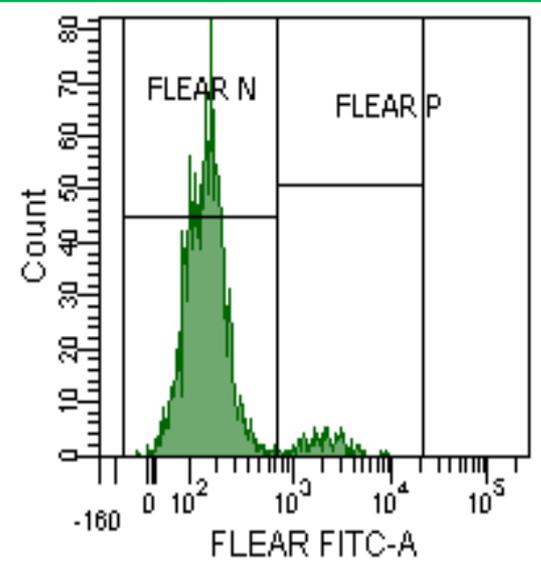
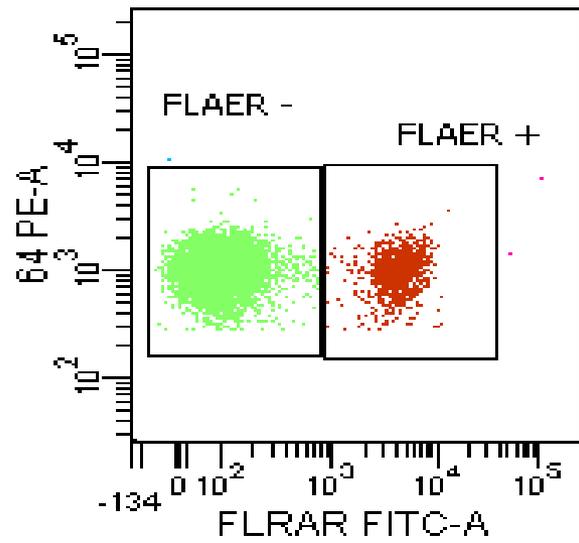
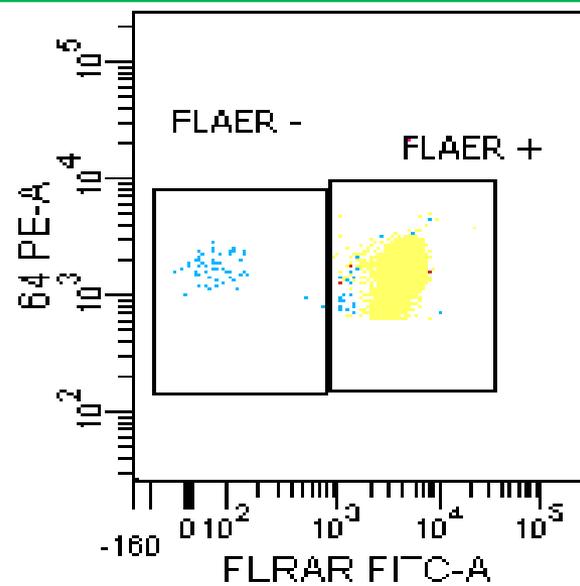


Illustration : Déficit sur les monocytes



❑ Diagnostic du clone HPN

❖ **Première manipulation** : 17 cas (63%).

❖ **Surveillance** : 10 cas (37%).

Première manipulation

- Absence de déficit : 03 cas.

- Déficit modéré : 07 cas.

✓ **Remarques sur les AM :**

- Déficit modéré d'un marqueur sur une seule lignée : 22 cas.

- Indication d'un suivi par un immunophénotypage par CMF/06 mois.

❑ Diagnostic du clone HPN

❖ **Suivi des clones HPN : 27 cas .**

➤ **PDV (non contrôlés) : 08 cas.**

❖ **Patients contrôlés :**

19 cas (nombre de manipulations : 03 (1 - 6))

➤ **Clone stable : 12 cas.**

➤ **Augmentation du clone : 06 cas (Grands clones : 04 cas) :**

6 mois après, l'un des patients a fait une thrombose étendue.

➤ **Diminution du clone : 01 cas.**

□ Discussion

La CMF a été déterminante pour le diagnostic d'HPN dans sa forme aplasante à 22,8% rejoignant les données de la littérature.

Groupe (Réfs)	Nombre AM	%
Notre étude	27/118	22.8
CPMC (VII CNH 2010) (3)	41/110	37
Tunis Menif (congrès maghrébin 2011)(7)	15/33	45
A. Rasa (Sujet ≤ 50 an) (4)		39.5
Basel (Br. Haematol 1988)		25
EBMT (Br. Haematol 1989)		20
French (Blood 1990)		10
SFH : Socie (Lancet 1996)(6)		30

Les clones HPN sont diagnostiqués dans 30 - 40% des aplasies au cours du diagnostic ou durant l'évolution .

□ Discussion

Dans notre étude, sur les 44 cas d'AM sévères, 09 cas ont développé un clone HPN soit 20,5%, ce qui rejoint les données de la littérature selon lesquelles 20% des AM sévères évolueront vers une HPN classique.

Régis Peffault de Latour. Un clone HPN ? And so what ?. Centre de référence aplasie médullaire.

❑ Discussion : Analyse de la taille du clone HPN

	Taille de clone	
Globules Rouges	27.29%	(06 – 82)
PNN	55%	(7.4 – 99.5)
Monocytes	55%	(12.9 – 93.5)

- La taille du clone sur la population érythrocytaire est inférieure à celle des PNN et des monocytes.
- Les érythrocytes du clone ont une durée de vie courte (hémolyse).
- Les transfusions : l'analyse des GR sous estime la taille du clone.

Analyse des PNN et des monocytes précise mieux la taille du clone HPN. (5).

□ Discussion

En cas de déficit modéré ou d'absence de déficit, l'indication de refaire une CMF est alors nécessaire et doit inclure un bilan d'hémolyse répété avec dosage des LDH.

Cela est vérifié dans notre étude puisque dans 10 cas où un clone HPN a été retrouvé, une thrombose s'est développée dans un cas après doublement de la taille du clone.

Cet intérêt du suivi a été confirmé par l'étude de B. Höchsmann qui a démontré lors du suivi de 155 cas de clone HPN, une augmentation significative de la taille du clone dans 28% des cas et dans 9% des cas apparition d'un nouveau clone.

Conclusion

Depuis longtemps, l'HPN a été considérée comme une maladie rare, mais le développement de la cytométrie en flux a permis l'amélioration de son diagnostic.

La CMF reste un examen clé dans le diagnostic des HPN et dans quelques cas il faudra répéter la recherche du clone après une première analyse négative en particulier en cas de tableau d'aplasie médullaire et d'hémolyse associée et aussi le répéter en cas d'un petit clone pour suivre son évolution dans le temps.

Références

- 1- Régis Peffault de Latour.** Hémoglobinurie paroxystique nocturne. Aplasie médullaire. Hématologie, vol. 14, n° spécial 3, juillet 2008.
- 2- Régis Peffault de Latour.** Un clone HPN ? And so what ?. Centre de référence aplasie médullaire – HPN. Hôpital Saint-Louis.
- 3- F. Harieche,** F. Boukhemia, N. Abdennebi, A. Talbi, F. Mehdid, N. Ramoune, N. Aouanouk, F. Zerhouni, R.M. Hamladji. Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne : Mise en évidence d'un clone HPN par cytométrie en flux. Service d'Hématologie-Greffe de moelle osseuse, CPMC, Alger.
- 4- B. Hochsmann et al.** Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. Ann Hematol. 2011.
- 5- DR. Sutherland,** Kueken et al. Diagnosing PNH with FACS and multiparameter flow cytometry. Cytometry 2007; 72 B : 167 - 177.
- 6- G. Socie,** JY. Mary et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria : long term follow up and prognostic factors. French Society of Hematology. Lancet. 1996; 25 : 1256 -64.
- 7- H. Menif et al.** Recherche de clone HPN par cytométrie en flux (CMF) : a propos de 71 cas. CRTS de Sfax. Tunis. Casablanca. 8^{ème} Congrès Maghrébin d'hématologie 2011.