



Revue Algérienne d'Hématologie

Sous l'égide de la Société Algérienne d'Hématologie et de transfusion Sanguine

N° 4

Mars 2011

DÉPOT LÉGAL : 2345 - 2009

N° ISSN : 2170 - 0729

HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE



Coordinateur de la revue :
Pr Ahmed Nacer Redhouane

Comité de rédaction :

Rédacteurs en chef :
Pr Hamladji Rose Marie
Pr Belhani Meriem

Membres :
Pr Ardjoun Fatma Zohra
Pr Abad Mohand Tayeb
Pr Touhami Hadj
Pr Ait Ali Hocine
Pr Zouaoui Zahia
Pr Bekadja Mohamed Amine
Pr Ahmed Nacer Redhouane
Pr Boudjerra Nadia
Pr Sidi Mansour Nourredine

Comité scientifique de la SAHTS :

Présidente :
Pr Hamladji Rose Marie

Membres :
Pr Belhani Meriem
Pr Ardjoun Fatma Zohra
Pr Abad Mohand Tayeb
Pr Touhami Hadj
Pr Ait Ali Hocine
Pr Zouaoui Zahia
Pr Bekadja Mohamed Amine
Pr Ahmed Nacer Redhouane
Pr Boudjerra Nadia
Pr Sidi Mansour Nourredine
Pr Ainas Lahlou
Pr Mesli Naima
Pr Griffi Fatiha
Pr Hamdi Salima
Pr Saidi Mahdia
Pr Benakli Malek
Dr Belakehal Salah Eddine
Dr Saidi Djamel

Composition du bureau de la SAHTS :

Président :
Bekadja Mohamed Amine

Vice présidents :
Saidi Mahdia
Belakehal Salah Eddine
Saidi Djamel

Secrétaire général :
Benakli Malek

Trésorière :
Boudjerra Nadia

AVANT-PROPOS

Ce numéro 4 de la revue Algérienne d'hématologie est consacré à l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN). La maladie HPN est une hémopathie acquise rare, clonale de la cellule souche hématopoïétique, caractérisée par son polymorphisme clinique et par ses complications graves et redoutables. Dans cette revue sont abordés les aspects cliniques, diagnostiques (en particulier l'apport de la cytométrie en flux) et thérapeutiques de la maladie HPN, se rapportant aux différents travaux présentés en communications orales lors du VII^{ème} congrès national d'Hématologie (Oran – 08-10 mai 2010). Vous trouverez également un article rapportant le consensus du protocole de diagnostic de l'HPN établi, par le Groupe Algérien de Cytométrie en flux, lors du 4^{ème} Workshop HPN en juin 2010.

A vous tous bonne lecture

Pr Ahmed Nacer Redhouane
Coordinateur de la revue

SOMMAIRE

ÉDITORIAL	04
L'HÉMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA	08
L'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE (HPN) DANS SA FORME HEMOLYTIQUE A PROPOS DE 07 CAS	18
APPLICATION DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX AU DIAGNOSTIC DE L'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE (HPN)	21
DIAGNOSTIC DES HEMOGLOBINURIES PAROXYSTIQUES NOCTURNES (HPN) PAR CYTOMETRIE EN FLUX (CMF)	29
APPORT DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE DIAGNOSTIC DE L'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE	33
HARMONISATION DU PROTOCOLE DE DIAGNOSTIC DE L'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE	39
HPN ET ECULIZUMAB	44
ALLOGREFFE MYELOABLATIVE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES GENO-IDENTIQUES REALISEES CHEZ 20 PATIENTS ATTEINTS D'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE	47

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN), hémopathie non maligne aux multiples facettes.

Rose Marie Hamladji

L'HPN dans sa forme clinique classique d'hémolyse intra-vasculaire chronique avec en particulier un taux élevé de LDH (lactico-déshydrogénase sérique 2 à 10 fois au-dessus du taux normal supérieur) et une hyper-réticulocytose sans aucun signe en faveur d'une anomalie de la moelle osseuse en dehors d'une hyperplasie érythroblastique de morphologie normale, représente la forme la plus rare, le deuxième tableau clinico-biologique est celui d'une HPN survenant dans le contexte d'une autre maladie médullaire, dans ce cas le patient présente des signes cliniques et biologiques d'hémolyse mais a aussi de manière concomitante, ou a eu, une histoire d'anomalie médullaire, soit quantitative : aplasie médullaire notamment traitée par immunosuppresseur dans 20 à 30% des cas soit qualitative : syndrome myélodysplasique (MDS) à type d'anémie réfractaire ou de MDS multilignée ou plus rarement myélofibrose. Tant dans la forme hémolytique classique que dans la forme hémolytique survenant dans le contexte d'une anomalie médullaire l'évolution de la maladie est compliquée de poussées hémolytiques plus ou moins sévères pouvant être accompagnées de douleurs abdominales, de signes fonctionnels (asthénie, spasme œsophagien, myalgies dysfonction érectile) et surtout d'accidents thrombotiques, il s'agit de thrombose veineuse cérébrale, abdominale (veines sus hépatiques responsables d'un syndrome de Budd-Chiari, portale ou mésentérique) des membres inférieurs, dont l'incidence est de 25% à 5 ans. Le troisième mode de présentation est celui de l'HPN dite subclinique (HPN-Sc) il s'agit de patient présentant un tableau d'insuffisance médullaire, soit une aplasie médullaire, soit une anémie réfractaire - MDS sans signe clinique ou biologique d'hémolyse chez lesquels un clone HPN habituellement de petite taille est détecté (1).

Le trait d'union entre ces tableaux clinico-biologiques est le fait maintenant bien établi que l'HPN est la conséquence de l'expansion clonale non maligne d'une ou plusieurs cellules souches hématopoïétiques (CSH) ayant acquis une mutation somatique du gène Phosphatidyl - Inositol - Glycane de classe A (PIG-A) situé sur le chromosome X. Ce gène est impliqué dans la biosynthèse d'une protéine d'ancrage, la Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) ce qui entraîne un défaut d'expression total ou partiel de toutes les protéines dont l'expression nécessite cette ancre dans toutes les cellules dérivées des CSH mutées (2). Le déficit de ces protéines ancrées (GPI - APs) est détecté par la quantification par cytométrie en flux (CMF) du CD55 ou DAF et du CD59 ou MIRL qui sont les protéines de régulation de la lyse du complément présentes sur les hématies mais aussi sur les autres cellules, le CD16 et CD66b GPI-APs exprimées sur les polynucléaires neutrophiles (PN) et le CD14 GPI-AP exprimée sur les monocytes.

Ainsi le diagnostic de certitude de l'HPN repose sur la CMF qui est devenue l'examen de référence, car plus sensible et

plus spécifique que les tests classiques de Ham Dacie et de sucrose (3). La CMF permet d'estimer la taille du clone exprimée en pourcentage de cellules négatives et le degré du déficit qui peut être total (type III), partiel (type II) ou mixte et l'absence de déficit (type I). Ainsi le diagnostic d'HPN peut être porté sur la présence d'un clone défini par la présence d'une population déficiente en au moins deux molécules GPI ancrées dans deux populations cellulaires différentes et lorsque la taille de ce clone est supérieure à 5%. Toutefois le choix des protéines ancrées à étudier est important en effet la taille du clone HPN étudiée sur les hématies par le CD55 et le CD59 est sous estimée du fait de l'hémolyse et après transfusion récente, de ce fait il est recommandé d'analyser les autres protéines ancrées sur les PN : le CD16 et le CD66b et le CD14 sur les monocytes qui donnent une information plus précise sur la taille du clone sauf dans les aplasies médullaires très sévères avec neutropénie très profonde.

Il est important de préciser quel est le contexte clinico-biologique dans lequel il est nécessaire de rechercher un clone HPN (1).

- Patient avec hémoglobinurie
- Patient avec une hémolyse intra-vasculaire (basée sur un taux élevé de LDH) à TCD négatif surtout avec carence en fer concomitante
- Patient avec thrombose dans un site inhabituel
 - Syndrome de Budd-Chiari
 - Autre site intra abdominal (veines mésentérique et portale)
 - Veine cérébrale
- Patient avec aplasie médullaire (au moment du diagnostic et une fois par an même en l'absence de signes d'hémolyse)
- Patient avec anémie réfractaire-MDS avec signes d'hémolyse
- Patient avec épisodes de dysphagie ou de douleur abdominale avec des signes évidents d'hémolyse intra vasculaire

L'HPN est une maladie rare comme l'attestent les résultats des études réalisées dans notre pays sur une période de 4 ans (4-5-6) rapportées dans cette revue, au total 72 cas d'HPN ont été diagnostiqués sur 218 patients testés, elle est surtout retrouvée dans un contexte de maladie médullaire dans 79% des cas (57/72) essentiellement aplasie médullaire dans 71% des cas (51/72), plus rarement de MDS dans 8% des cas (6/72), l'HPN classique ne représente que 15% des cas (11/72) et enfin dans 5% des cas (4/72) dans un contexte de thrombose. En ce qui concerne la recherche du clone HPN au cours de l'aplasie médullaire il est retrouvé dans 37% des cas (41/110), il faut souligner sa fréquence plus élevée 48% (29/60) des aplasies après traitement immunosuppresseur (4). Les patients porteurs d'HPN dans notre pays sont jeunes

avec une moyenne d'âge de 31 ans (6 à 76) cette constatation rejoint celle de la série française (7).

Le traitement de l'HPN dans sa forme hémolytique classique ou avec leucopénie et/ou thrombopénie modérées, bien qu'elle représente la forme la plus rare est celle qui pose encore des problèmes non résolus.

Les deux buts du traitement sont d'une part de réduire l'hyperhémolyse et d'autre part de traiter et/ou de prévenir les accidents thrombotiques qui sont liés à l'hyperhémolyse.

- Le traitement classique par les androgènes (noréthandrolone 1 cas et Danazol 6 cas) appliqués dans 7 cas rapportés dans cette revue (8) ont permis d'obtenir une bonne réponse sur l'hémolyse chronique dans 4 cas sur 7 (hémoglobine 9 à 13g) et une réponse partielle dans 2 cas sur 7, un échec a été observé chez un patient qui a évolué vers une aplasie médullaire, ces résultats ont été retrouvés par Rosse (9). Cependant ce traitement n'empêche pas les crises hémolytiques qui peuvent être atténuées dans leur sévérité et leur durée par une corticothérapie de courte durée à 1mg/kg/ jour. En ce qui concerne les accidents thrombotiques qui sont les plus graves, responsables d'au moins 22% des décès, le problème posé est celui de leur prévention qui peut être envisagée par un traitement anticoagulant (anti vitamine K) chez les patients présentant un déficit des GPI-APs supérieur ou égal à 50% sur les granuleux (10). Ce traitement est toujours indiqué précédé par une héparinothérapie en cas d'accident thrombotique avéré, bien qu'il ne soit pas protecteur à 100% du risque de récurrence.

- Actuellement un anticorps monoclonal anti fraction C5 du complément l'Eculizumab a prouvé son efficacité dans la réduction de l'hyperhémolyse et également dans la prévention des accidents thrombotiques, toutefois en raison de son coût, de son mode d'administration par voie veineuse et du fait qu'il n'éradique pas le clone HPN nécessitant de ce fait sa prescription à vie constituent des obstacles majeurs à son utilisation dans notre pays.

- Quant à l'allogreffe de CSH, elle est le traitement de choix en cas d'HPN dans sa forme aplasique (11) cependant en cas d'impossibilité de greffe, soit en raison de l'âge soit en l'absence de donneur HLA compatible, le traitement immunosuppresseur devient la meilleure indication car il est démontré que les patients aplasiques ainsi que les patients MDS répondent mieux à ce traitement lorsqu'ils ont un clone HPN. Dans la forme hémolytique de HPN l'allogreffe mérite d'être sérieusement discutée dans notre pays en raison du caractère curatif de la procédure et des résultats obtenus par une étude récente (12) portant sur les résultats de l'allogreffe chez 26 patients présentant une HPN dont 22 dans sa forme hémolytique avec une survie sans maladie à 10 ans à 65% pour 23 patients greffés avec un donneur génodentique et à 73% pour ceux greffés avec un conditionnement myéloablatif et également du fait de l'âge jeune de nos patients, de la forte probabilité d'avoir un donneur génodentique et de la disponibilité d'un centre d'allogreffe.

RÉFÉRENCES

1. Parker C. Diagnostic and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Blood 2.005 ; 106 : 3699 – 3709
2. Parker C ; Ware R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Wintrobe's Clinical Hematology 12 th Edition 2.009 : 998 – 1020
3. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Blood 1996 ; 87 : 5332-5340
4. Harièche.F ; Benakli.M ; Mehdi.F ; Abdennebi.N ; Boukhemia.F ; Ahmed-Nacer.R ; Zerhouni.F ; Hamladji.RM : Application de la cytométrie en flux au diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne
Revue Algérienne d'Hématologie 2011 ; 4 : 21 - 26
5. Hamdi. S ; Hamouda.H ; Achichi.A ; Bouhadda.Z : Apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne
Revue Algérienne d'Hématologie 2011 ; 4 : 33 - 37
6. Oukid.S ; Taoussi.S ; Bouchakor.Y ; Boucherit.C ; Lamraoui.F ; Chebrek.S ; Ghezlane.C ; Abad.MT : Aspects cliniques et diagnostiques des hémoglobinuries paroxystiques nocturnes (HPN)
Revue Algérienne d'Hématologie 2011 ; 4 : 29 - 32
7. Peffault de Latour.R ; Mary.JY and al : Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : Natural history of disease subcategories
Blood 2.008 ; 112 : 3099-106
8. Tensaout.F ; Boudjerra.N ; Boukhemia.F ; Abdennebi.N ; Ait Amer.N ; Harièche.F ; Belhadri.F ; Zerhouni.F ; Hamladji.RM : L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) dans sa forme hémolytique à propos de 7 cas
Revue Algérienne d'Hématologie 2011 ; 4 : 18-20
9. Rosse.WF : Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Blood 1982 ; 60 : 20-23
10. Hall.C ; Richards.S ; Hillman.P : Primary prophylaxis with Warfarin prevents thrombosis in paroxysmal hemoglobinuria
Blood 2.003 ; 102 : 3587-91
11. Mehdi.F ; Ahmed-Nacer.R ; Benakli.M ; Belhadji.R ; Hamladji.RM
Allogreffe myéloablatif de cellules souches hématopoïétiques géno-identiques réalisée chez 20 patients atteints d'hémoglobinurie paroxystique nocturne
Revue Algérienne d'Hématologie 2011 ; 4 : 47 - 51
12. Santarone.S ; Bacigalupo.A ; Risitano.A ; and al : Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : long-term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO).
Haematologica 2.010 ; 95 : 983-88

Imatib

Imatinib

*La première thérapie
ciblée*



L'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria

Régis Peffault de Latour¹

1 : AP-HP Hôpital Saint Louis, Service d'Hématologie - Greffe, & Unité
INSERM 728, Paris

Mots clés.

Hémoglobinurie paroxystique nocturne, Aplasie médullaire, Molécules GPI, PIG-A, Complément

Key words.

Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, Aplastic anemia, glycosyl phosphatidilinositol-anchored proteins (GPI-AP), PIG-A, Complement

Correspondance:

Docteur Régis Peffault de Latour, MD, PhD
Service d'Hématologie Greffe, & Inserm U728,
Hôpital Saint-Louis
1 Av. Vellefaux, 75010 Paris, France.
Phone: +33 1 42 38 50 73; Fax: +33 1 42 49 96 36
E-mail: regis.peffaultdelatour@sls.aphp.fr

RESUME

L'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne (HPN) ou maladie de Marchiafava & 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 de glycoprophosphatidylinositol (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). L'HPN est la conséquence d'un déficit d'ancrage membranaire de ces deux protéines, se manifestant sur le plan clinique par une hémolyse intra vasculaire. On note aussi souvent dans cette maladie une insuffisance médullaire ainsi que des épisodes thromboemboliques. Les progrès de la cytométrie en flux en font l'outil diagnostique de référence mettant en évidence le déficit des molécules GPI liées. Sur le plan nosographique, on oppose l'HPN classique, très hémolytique, à la forme aplasique (syndrome aplasie-HPN), où le clone peut être retrouvé lors du diagnostic ou durant l'évolution de la maladie. Le facteur pronostic majeur de l'HPN reste la survenue de complications

thromboemboliques, de localisations souvent atypiques (veines intra-abdominales - syndrome de Budd-Chiari - et localisations cérébrales). Les événements thrombotiques constituent 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 génodentique ou de traitement immunosuppresseur en l'absence de donneur. Les complications thrombotiques répétées, restent, même à l'heure actuelle, des facteurs affectant la survie des patients.

ABSTRACT

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

IMATIB : 100 mg et 400 mg. **Présentations et dosages** : Gélules 100 mg : boîte de 120 gélules. Gélules de couleur jaune foncée à orange brunâtre, rondes, bi-convexe, biseautées. Comprimés 400 mg : boîte de 30 comprimés. Comprimés enrobés de jaune foncé à orange brunâtre, ovales, biconvexes, biseautés. Composition : Imatib 100 mg Chaque gélule contient : 100 mg d'imatinib mésylate. Excipients : croscopolone, cellulose microcristalline (Avicel PH 102), dioxyde de silicone colloïdal, stéarate de magnésium. Imatib 400mg : Chaque comprimé contient : 400 mg d'imatinib mésylate. Excipients : dioxyde de silicone colloïdal, hypromellose, cellulose microcristalline, croscopolone, sodium croscarmellose, stéarate de magnésium, Opadry jaune 04F52022, eau purifiée. **Forme pharmaceutique** : Comprimés et gélules pour administration orale. **Pharmacologie** : Mode d'action : Le mésylate d'imatinib est un inhibiteur de la protéine-tyrosine kinase qui inhibe la tyrosine kinase bcr-abl anormale, produite par l'anomalie chromosomique de Philadelphie dans la leucémie myéloïde chronique (LMC). L'imatinib inhibe la prolifération et provoque l'apoptose des lignées cellulaires bcr-abl positives ainsi que les cellules nouvelles des leucémies myéloïdes chroniques chromosome de Philadelphie positives. L'imatinib inhibe la formation de colonies dans les essais in vitro utilisant le sang périphérique et la moelle osseuse provenant de patients atteints de LMC. In vivo, l'imatinib inhibe la croissance des cellules bcr-abl myéloïdes du rat ainsi que les lignées bcr-abl positives issues de patients atteints de LMC en crise blastique. L'imatinib est aussi un inhibiteur des récepteurs des tyrosine kinases du récepteur du PDGF et du SCF c-kit et il inhibe les processus cellulaires médiés par le PDGF et le SCF. In vitro, l'imatinib inhibe la prolifération et induit l'apoptose des cellules de GIST (tumeur stromale gastro-intestinale) qui expriment une mutation active du c-kit. **Pharmacocinétique** : Les propriétés pharmacocinétiques de l'imatinib ont été déterminées chez des sujets sains et dans une population de plus de 900 patients. Les propriétés pharmacocinétiques sont similaires chez les patients atteints de LMC et chez les patients sourant de GIST. L'imatinib est bien absorbé après administration par voie orale, la Cmax étant obtenue en 2 à 4 heures après la prise du médicament. La biodisponibilité moyenne est de 98%. Suivant l'administration orale à des volontaires sains, la demi-vie d'élimination de l'imatinib et de son principal métabolite, le dérivé N-déméthyl (CGP74588) sont d'environ 18 et 40 heures respectivement. L'AUC moyenne augmente proportionnellement aux doses lorsque celles-ci varient de 25 mg à 1000 mg. L'administration de doses répétées ne modifie pas, de façon significative, les caractéristiques pharmacocinétiques de l'imatinib et l'accumulation, à l'état d'équilibre est de 1,5 à 2,5 fois plus élevée que lorsque le produit est administré une fois par jour. Aux concentrations cliniques, la liaison de l'imatinib aux protéines plasmatiques est, in vitro, d'environ 95%, principalement avec l'albumine et l'alpha-1-acide glycoprotéine. Le CYP3A4 est le principal enzyme responsable du métabolisme de l'imatinib. Les autres enzymes du cytochrome P450, tels que CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 et CYP2C19 jouent un rôle mineur dans son métabolisme. Le principal métabolite actif circulant chez les humains est le dérivé pipérazine N-déméthylé, formé principalement par le CYP3A4. Il montre, in vitro, une puissante activité similaire à celle du principe L'AUC plasmatique de ce métabolite est d'environ 15% de l'AUC de l'imatinib. La liaison aux protéines plasmatiques du métabolite N-déméthylé CGP74588 est semblable à celle du principe. Les études sur microsomes hépatiques humains ont montré que l'imatinib est un puissant inhibiteur compétitif de CYP2C9, CYP2D6 et CYP3A4/5 avec des valeurs de Ki de 27, 7,5 et 8 µm respectivement. L'élimination de l'imatinib se fait principalement dans les selles, sous forme de métabolites. Après administration orale, la dose d'imatinib marquée de C14 s'élimine à 81% de la dose administrée en 7 jours, dans les selles (68%), et dans l'urine (13%). 25% de l'imatinib ont été éliminés sous forme inchangée (5% dans l'urine et 20% dans les selles), le reste a été éliminé sous forme de métabolites. La clairance de l'imatinib, chez un patient âgé de 50 ans pesant 50 kg, est de 8 l/heure, tandis que chez un patient âgé de 50 ans pesant 100 kg, la clairance est de 14 l/heure. La variabilité, de 40% entre les patients ne nécessite pas un ajustement de la posologie en fonction du poids corporel et/ou de l'âge mais justifie un monitoring attentif de la toxicité due au produit. **Indications** : Imatinib est indiqué en cas de : •Leucémie myéloïde chronique Philadelphie positive nouvellement diagnostiquée (Ph+ LMC). •LMC Ph+ en crise blastique (BC), en phase accélérée (AP) ou en phase chronique (CP) après échec du traitement par interféron (IFN). •Patients pédiatriques sourant de LMC Ph+ en phase chronique. •Leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) Ph+. •Syndrome myélodysplasique/myéloprolifératif (MDS/MPD). •Mastocytose systémique agressive (ASM). •Syndrome hyperéosinophilique (HES) et/ou de leucémie éosinophilique chronique (LEC). •Dermatofibrosarcome protubérant (DFSP). •Tumeurs gastro-intestinales stromales Kit+ (GIST). **Posologie et mode d'administration** : Le traitement doit être initialement institué par un médecin expérimenté dans le traitement de patients sourant d'actions hématologiques malignes ou de sarcomes malins, selon les cas. La posologie prescrite doit être administrée par voie orale, avec un grand verre d'eau au cours d'un repas. Pour les doses de 400 mg et plus, l'Imatib 400 mg est préconisé, pour les autres doses de moins de 400 mg, l'Imatib 100 mg est préconisé. Les doses de 400 mg ou 600 mg seront administrées une fois par jour, tandis qu'une dose de 800 mg devra être administrée en deux prises quotidiennes de 400 mg. Chez les enfants, le traitement par Imatib doit être administré, soit en une fois, soit divisé en deux, une dose étant administrée le matin et l'autre le soir. Il n'y a pas d'expérience de traitement d'enfants de moins de 2 ans par Imatib. Une posologie quotidienne de 800 mg ou plus doit être administrée sous forme de comprimés dosés à 400 mg pour diminuer l'exposition au fer. Le traitement peut être poursuivi aussi longtemps qu'il n'est pas observé d'aggravation de la maladie ou d'acceptable toxicité. Les patients sourant d'insuffisance hépatique bénigne à modérée ne justifient pas un ajustement de la posologie et doivent recevoir la posologie recommandée. Chez les patients sourant d'insuffisance hépatique grave il convient de réduire de 25% la posologie recommandée. **Contre-indications** : La prescription d'Imatib est contre-indiquée chez les patients présentant une hypersensibilité à l'Imatinib ou à l'un des composants du médicament. **Mises en gardes et précautions d'emploi** : Rétention hydrique et oedème : L'Imatinib mésylate est fréquemment à l'origine d'oedèmes et parfois responsable d'une grave rétention liquidienne. Les malades doivent être pesés et monitorés régulièrement pour que soient observés les signes et symptômes de rétention liquidienne. Une prise de poids rapide et inattendue doit être traitée par des moyens appropriés. Irritation gastro-intestinale : L'Imatinib mésylate pouvant parfois provoquer une irritation gastro-intestinale, ce médicament doit être administré avec de la nourriture et un grand verre d'eau pour réduire l'importance de ce problème. Hémorragie : Chez les patients sourant de GIST, des saignements gastro-intestinaux et/ou intra-tumoraux peuvent survenir au niveau de la tumeur. Toxicité hématologique : Le traitement par Imatinib mésylate peut provoquer une neutropénie ou une thrombocytopénie. Un hémogramme complet doit être pratiqué chaque semaine pendant le premier mois du traitement, puis deux fois par semaine pendant le deuxième mois, puis périodiquement en fonction des indications de la clinique. Dans la LMC, la survenue de ces cytopénies dépend du stade de la maladie et est plus fréquemment observée chez les malades au stade chronique. Hépatotoxicité : Une hépatotoxicité parfois sévère peut survenir pendant le traitement par Imatinib mésylate. La fonction hépatique (transaminases, bilirubine et phosphatase alcaline) doit être explorée avant le commencement du traitement puis mensuellement ou selon les observations cliniques. Les écarts observés doivent être corrigés par interruption du traitement et/ou réduction de la posologie. Les malades sourant d'insuffisance hépatique doivent être soigneusement monitorés et ce en raison du risque d'augmentation des concentrations sériques de l'imatinib. Il n'existe pas d'études réalisées chez des patients sourant d'insuffisance hépatique, il ne peut donc être fait de recommandation relative à une adaptation de la posologie. Toxicité à long terme : Il n'existe pas de données à long terme car le suivi de la plupart des patients traités par Imatinib mésylate est fréquemment de durée relativement courte. Interactions médicamenteuses : Médicaments pouvant augmenter la concentration plasmatique de l'Imatinib : La prudence est recommandée lors de l'administration d'Imatinib mésylate en concomitance avec des inhibiteurs du CYP3A4 (par exemple kétoconazole, itraconazole, érythromycine, clarithromycine). Les produits inhibant l'activité de l'isoenzyme cytochrome P450 (CYP3A4) peuvent ralentir le métabolisme et donc augmenter les concentrations de l'Imatinib mésylate. Médicaments pouvant diminuer la concentration plasmatique de l'Imatinib : Les produits inducteurs de l'activité du CYP3A4 peuvent accélérer le métabolisme et donc réduire la concentration plasmatique de l'Imatinib (par exemple dexaméthasone-e, phénytoïne, carbamazépine, rifampicine, phénobarbital, millepertuis). Médicaments dont la concentration plasmatique peut être modifiée par l'Imatinib mésylate : L'Imatinib mésylate augmente la Cmax moyenne et l'AUC de la simvastatine (CYP3A4 substrat) respectivement de 2 et 3,5 fois, suggérant une inhibition de l'activité du CYP3A4 par l'Imatinib. Une attention particulière est recommandée en cas d'administration d'Imatinib mésylate avec des substrats de CYP3A4 ayant une marge d'activité thérapeutique étroite (par exemple ciclosporine ou pimozide). L'Imatinib mésylate augmente la concentration plasmatique d'autres médicaments métabolisés par le CYP3A4 (par exemple triazolo-benzodiazépines, dihydropyridines inhibiteurs des canaux calciques et certains inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, etc). La warfarine étant métabolisée par le CYP2C9 et le CYP3A4, les patients qui doivent recevoir un traitement anticoagulant seront mis sous héparine de bas poids moléculaire ou sous héparine. In vitro l'Imatinib mésylate inhibe l'activité des isoenzymes du cytochrome P450 tels que le CYP2D6 à la même concentration que celle qui active l'activité du CYP3A4. L'exposition systémique aux substrats du CYP2D6 sera augmentée en cas d'administration concomitante avec l'Imatinib mésylate. Il n'a pas été réalisé d'étude sur ce sujet, la prudence est donc recommandée. **Grossesse** : Il doit être recommandé aux femmes en âge de procréer d'éviter d'être enceintes lorsqu'elles sont traitées par imatinib. Si ce traitement est administré durant la grossesse ou si la patiente tombe enceinte pendant le traitement, elle doit être informée du risque encouru par le fœtus. **Allaitement** : Il convient de choisir entre l'arrêt de l'allaitement et l'arrêt du traitement par imatinib en prenant en considération l'intérêt du traitement pour la mère. **Effets indésirables** : 1/- Leucémie - myéloïde chronique : La majorité des malades traités par l'Imatinib mésylate sont victimes d'effets indésirables à un moment ou à un autre du traitement. La plupart de ces effets sont légers ou modérés. Les fréquents effets indésirables les plus signalés sont nausées, vomissements, diarrhée, oedème et crampes musculaires. L'oedème est le plus souvent périorbitaire ou localisé dans les membres inférieurs et est traité par les diurétiques et d'autres mesures de soutien ou par réduction de la dose d'Imatinib mésylate. Les rétentions hydriques localisées ou généralisées incluant épanchement pleural, ascite, oedème pulmonaire et rapide prise de poids avec ou sans oedème superciel. Ces incidents sont dose dépendants et surviennent plus fréquemment lors des crises blastiques et dans les phases d'accélération (lorsque la dose est de 600 mg/jour) et sont fréquents chez les personnes âgées. Ces incidents sont habituellement traités par interruption du traitement par l'Imatinib mésylate et par des diurétiques et autres mesures de soutien. Toxicité hématologique : Les cytopénies et particulièrement la neutropénie et la thrombocytopénie, sont observées dans la leucémie myéloïde chronique. La survenue de cytopénies, chez les patients souffrant de leucémie myéloïde chronique, dépend du stade de la maladie et il a été observé une fréquence des neutropénies et des cytopénies de grade 3 ou 4 entre 2 et 3 fois plus élevée dans les crises blastiques et les phases d'accélération que dans la phase chronique. Hépatotoxicité : L'élévation des taux de transaminase et de bilirubine peut survenir. Elle est habituellement traitée par une diminution de la dose ou l'interruption du traitement. 2/- Tumeurs gastro-intestinales stromales : La majorité des malades traités par l'Imatinib mésylate sont victimes d'effets indésirables à un moment ou à un autre du traitement. Les effets indésirables les plus fréquemment signalés sont oedème, nausées, diarrhée, douleurs abdominales, crampes musculaires, fatigue et rash. La plupart de ces incidents sont de gravité légère ou modérée. **Surdosage** : L'expérience de doses de plus de 800 mg est limitée. Des cas isolés de surdosage ont été rapportés. En cas de surdosage, le patient doit être mis sous surveillance et un traitement de soutien approprié doit être institué. **Conditions de conservation** : Conserver à une température inférieure à 30°C LISTE I. DE : IMATIB 100 mg : 05/05A 105/182. IMATIB 400 mg : 09/05C 113/182.

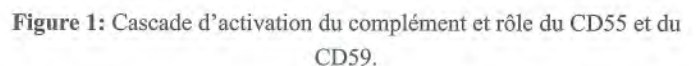
1. INTRODUCTION

2. PHYSIOPATHOLOGIE

Dès la première description de la maladie, au début du siècle, la sensibilité anormale des globules rouges à l'action lytique du complément a été considérée comme la caractéristique principale de la maladie(4). Elle a été à la base des tests diagnostiques de Ham Dacie et du test au sucrose. Les globules rouges de patients atteints d'HPN sont identifiés, indirectement, par leur hémolyse sélective en présence de complément activé en milieu acide, ou en présence de sucrose. Cette sensibilité anormale des globules rouges à l'action du complément a très vite fait évoquer un déficit membranaire impliquant un système de régulation de la cascade d'activation du complément.

2.1.2. L'absence de molécules régulatrices de

Les voies (classique et alterne) d'activation du complément sont rappelées dans la Figure 1. Ces 2 voies d'activation se rejoignent en une voie effectrice commune conduisant à la formation d'un complexe multimoléculaire appelé complexe lytique ou complexe d'attaque membranaire (CAM). L'étape centrale d'activation est la formation de fragment activé de la fraction C3 (C3b) par les C3 convertases des 2 voies d'activations. Au début des années 1980, plusieurs équipes ont démontré que 2 protéines, dont le rôle est d'inhiber l'action du complément, n'étaient pas exprimées à la surface des globules rouges de patients atteints d'HPN. Ces 2 molécules sont le DAF (decay accelerating factor) ou CD55 qui agit au niveau des C3 et C5 convertases, et le MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis) ou CD59, qui agit en inhibant la formation du complexe d'attaque membranaire [revues dans (5, 6)].



A la suite de ces travaux démontrant le défaut d'expression du CD55 et du CD59, d'autres déficits moléculaires ont été identifiés sur les cellules de patients atteints d'HPN (Tableau 1). Comment alors expliquer le fait que des molécules dont les fonctions sont apparemment aussi éloignées comme par exemple le DAF et la molécule d'adhésion LFA3 (CD58) soient manquantes dans l'HPN ? La réponse à cette question a été apportée par le fait que toutes ces molécules présentent un élément structural commun : elles sont attachées à la membrane par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) (5, 7).

2.2 Aspects biochimiques et moléculaires de l'HPN.

2.2.1. 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). 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 3 molécules de mannose dont la troisième porte un éthanol amine phosphate. Le groupement amine primaire de l'éthanolamine est engagé dans une liaison peptidique avec la partie C-terminale de la protéine ancrée(8).

2.2.2. Biosynthèse de l'ancore GPI.

L'assemblage biochimique de l'ancore GPI dans le réticulum endoplasmique a été démembré grâce à trois systèmes expérimentaux: la biosynthèse de l'acétyl-cholinestérase érythrocytaire, celle d'une protéine du trypanosome (VSG), et l'étude de lignées de lymphome murin

Protéines du complément	DAF (CD55) MIRL (CD59) protéine porteuse du C8 (HRF)
Enzymes	acétylcholinestérase (érythrocyte) phosphatase alcaline (leucocyte) 5'-Exonucléotidase (lymphocyte) CD73
Récepteurs	Fcγ-type III (CD16a) récepteur à l'urokinase (UPAR), CD87 récepteur aux folates récepteur protéine porteuse des endotoxines (CD14) récepteurs du système immunitaire - LFA-3 (CD58) - CD48 (lymphocytes) - CDw52 (campath-1)
Autres protéines	CD24 CD66c et 66e CD67 CDw108 CDw109 p-50-80 (granuleux)

Tableau I : les principales protéines GPI chez l'homme.

déficientes pour l'expression d'une molécule GPI (l'antigène Thy-1). Ces dernières ont été d'un apport essentiel à la compréhension de la voie de biosynthèse de l'ancore GPI. En effet 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'ancore GPI. Trois classes de complémentation (A, C, et H) sont incapables de synthétiser le premier métabolite (N-acétyl-glucosaminyl-phosphatidylinositol, NacGlc-PI). Cette étape nécessite donc au moins le produit de 3 gènes (8-10).

2.2.3. Le clonage du gène PIG-A et la biologie moléculaire de l'HPN.

Une étape fondamentale dans la compréhension de la maladie a été franchie grâce à l'établissement de lignées lymphoblastoïdes issues de patients atteints d'HPN(11). L'étude de ces lignées a permis de montrer que dans l'HPN, le déficit GPI était dû justement à l'atteinte des premières étapes de la voie de biosynthèse (NacGlc-PI). La synthèse du NacGlc-PI est, selon la classification en groupe de complémentation, susceptible de faire intervenir trois gènes : les gènes PIG-A, PIG-C et PIG-H. L'ADN complémentaire (ADNc) de deux de ces gènes a été cloné et séquencé (PIG-A & PIG-H). Le groupe du Dr Kinoshita(12, 13) a démontré que la transfection de l'ADNc de PIG-A restaurait le déficit GPI de lignées lymphoblastoïdes issues de patients atteints d'HPN et a mis en évidence les anomalies moléculaires de l'ARN messager et du gène PIG-A dans ces lignées. Mais aussi et surtout, ce groupe a démontré l'existence des mêmes anomalies moléculaires dans les granuleux des patients atteints d'HPN (14). Des conclusions analogues sont issues de travaux contemporains du groupe de Lucio Luzzatto(15, 16).

Alors que 3 gènes, dont deux sont connus, sont responsables de la synthèse du NacGlc-PI, pourquoi un seul, à ce jour, est responsable de l'HPN ? Ceci est d'explication très récente : le gène PIG-A est situé sur le chromosome X (en Xp22.1) alors que PIG-H est situé sur un autosome (en 14q11-24)(17). 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 (par inactivation somatique aléatoire d'un des chromosomes X) que chez l'homme, un seul allèle est exprimé. Enfin, la structure génomique

de PIG-A, et de son homologue murin Pig-a(18), a été déterminée. Le gène PIG-A comporte six exons répartis sur 17 Kb [revue dans (19)]. Point important, les mutations décelées à ce jour se situent sur l'ensemble du gène, il est illusoire de croire au développement d'un diagnostic moléculaire en pratique clinique, pour l'HPN.

3. Physiopathologie et signes cliniques.

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, les globules rouges des patients ré expriment à leur surface des antigènes cryptiques (du système Th). Les antigènes Th sont alors reconnus par le système immunitaire, celui-ci active le complément, qui n'est plus régulé par CD55 et CD59, aboutissant en une crise hémolytique. 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 (20). 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(21). 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)(22). 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 (23). 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(24-26). Les différentes hypothèses sont résumées dans la Figure 2. D'autres aspects de la

physiopathologie de l'HPN demeurent néanmoins largement méconnus: Quelle est le mécanisme de l'hypoplasie médullaire ? Existe-t-il un déficit immunitaire chez ces patients (lymphocytes GPI-, altération du chimiotactisme des polynucléaires GPI-) ?

3. DIAGNOSTIC DE L'HPN

Les tests classiques, test de Ham et Dacie et test au sucrose sont actuellement abandonnés et le diagnostic est de nos jours assuré par la cytométrie en flux. Cette technique offre de

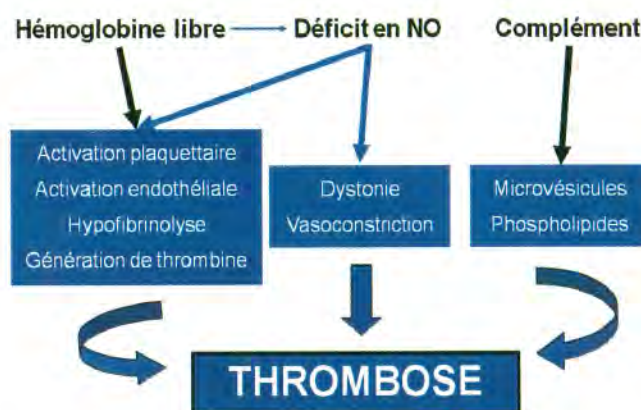


Figure 2 : Principales hypothèses expliquant la survenue de thromboses en cas d'HPN

multiples avantages [revue dans (7)]. Elle permet l'analyse rapide des différentes populations leucocytaires et lymphocytaires à partir du sang total (ou éventuellement après séparation cellulaire dans certains protocoles expérimentaux). Comme pour le test de Ham Dacie elle permet de distinguer les 3 populations cellulaires (HPN de type I, II, ou III). Les résultats obtenus peuvent être exprimés : en pourcentage de cellules négatives (importance relative du clone dans la population étudiée) et/ou en moyenne d'intensité de fluorescence (unité arbitraire en échelle logarithmique). La sensibilité de la cytométrie en flux dans le diagnostic d'un déficit des molécules GPI permet de détecter des clones dont l'importance n'excède pas quelques pourcents. En pratique, pour la majorité des molécules étudiées, un déficit peut être considéré comme significatif lorsque le pourcentage de cellules négatives est supérieur à 5%. Soulignons la nécessité absolue (liée à des contraintes techniques, et de rares problèmes particuliers) d'utiliser au moins deux anticorps reconnaissant deux molécules GPI différentes et d'étudier deux populations cellulaires différentes.

4. ASPECTS CLINIQUES

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 sévère (27). 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.

En fait, ces présentations sont très schématiques et le polymorphisme clinique de cette maladie est important. Lors du diagnostic, dans la série récente de la Société Française d'Hématologie (SFH)(3), la moyenne d'âge était bien de 34 ans mais près de 14% des patients avaient un diagnostic avant l'âge de 20 ans (5% étaient des enfants de moins de 16 ans). Sur le plan clinique, le mode d'entrée dans la maladie est un épisode de thrombose pour pratiquement un patient sur 10 et au diagnostic, 15% des patients sont infectés, complications méconnues et sous-estimées des patients atteints d'HPN. Sur le plan biologique, seul un tiers des patients avait une anémie isolée et 40% des patients se présentaient initialement avec une pancytopénie, généralement modérée. Le myélogramme montre fréquemment dans ce dernier cas une moelle non désertique. L'HPN fait donc partie des diagnostics à évoquer devant une pancytopénie à moelle «riche». Près d'un quart des patients ayant une HPN ont, dans notre expérience, un diagnostic préalable d'aplasie médullaire et, élément supplémentaire de réflexion, la mise en évidence d'une HPN après traitement immunosuppresseur des aplasies médullaires est de l'ordre de 20 à 30%.

La médiane de survie des patients est de 22 ans. Outre les douleurs abdominales dont l'étiologie exacte est encore incertaine, et les complications infectieuses (infections récurrentes de la sphère ORL et pulmonaires, en particulier), l'histoire

naturelle d'un patient atteint d'HPN peut être marquée par des complications beaucoup plus sévères. Ainsi, chez les patients atteints d'HPN de novo la probabilité de développer une pancytopénie durant l'évolution est estimée à 20% à 10 ans. Le risque de développement d'un syndrome myélodysplasique ou d'une leucémie aiguë est classique mais rare (5 et 2,5% à 10 ans, respectivement). Le problème majeur qui vient grever l'évolution des patients atteints d'HPN sont les thromboses (qui peuvent être inaugurales comme décrit ci-dessus). L'incidence cumulée de thromboses dans la série de la SFH est de près de 30% à 10 ans (3). Les deux localisations les plus fréquentes de ces thromboses sont les veines sus-hépatiques (syndrome de Budd-Chiari, 45%) et le système nerveux central (31%). Les épisodes de thromboses représentent dans l'étude de la SFH la première cause de décès, avant les complications infectieuses et l'évolution vers une myélodysplasie ou une leucémie aiguë. Les facteurs affectant de manière indépendante la survie de ces patients sont la période diagnostique (avant 1996), l'âge (plus de 40 ans au moment du diagnostic), l'anémie et la neutropénie lors du diagnostic, le fait de ne pas être traité dans la première année (reflet de l'absence de gravité de certains malades), et la survenue de complications comme l'aplasie médullaire, les hémopathies malignes et surtout les complications thrombotiques [RR 15.4 (95% CI 9,3 to 25,4), $p < 0,0001$].

L'étude récente de la SFH a permis pour la première fois d'analyser séparément l'histoire naturelle de patients diagnostiqués avec une HPN de forme classique de ceux présentant une forme aplasique(3). Les patients atteints d'HPN de forme classique sont volontiers plus âgés (40 ans versus 30 ans) et présentent plus fréquemment des épisodes de douleurs abdominales (35% versus 20%). Sur le plan biologique, la taille du clone est plus élevée avec un patient sur deux ayant plus de 50% de cellules négatives pour l'ancre GPI (versus 25% pour la forme aplasique). La forme classique est grevée d'un moins bon pronostic comme en témoigne la médiane de survie de 18 ans alors que cette médiane n'est pas atteinte pour la forme aplasique dans l'étude. Durant l'évolution, environ 20% des patients ayant une forme classique présenteront une aplasie médullaire témoignant comme largement rapportée de l'étroite relation entre HPN et aplasie médullaire. Si l'évènement thrombose était une complication connue de la forme classique (incidence cumulée à 10 ans de près de 40% !), l'étude de la SFH a permis d'illustrer le risque aussi élevé de complications

thrombotiques pour la forme aplasique de l'ordre de 30% à 10 ans, jusque là largement sous estimée. La première cause de mortalité reste cet événement thrombotique, quelle que soit la forme de la maladie, et qui peut survenir à n'importe quel moment au cours de l'histoire naturelle de l'HPN. Le grand nombre de malades de l'étude de la SFH a permis d'analyser les facteurs de risques associés à la survie pour chaque forme d'HPN. Pour la forme classique, la période (<1985), l'âge (>40 ans) et le fait de ne pas avoir été traité par androgènes apparaissent comme délétères, ainsi que l'évolution vers l'aplasie médullaire. Concernant la forme aplasique, on retrouve un rôle protecteur du traitement immunosuppresseur, illustrant l'apport de ce traitement dans la prise en charge des aplasies médullaires au sens large. Enfin, la complication thrombose est associée à un mauvais pronostic dans les deux formes de la maladie témoignant encore du rôle majeur de cette complication dans l'évolution des patients atteints d'HPN. Cette analyse des deux formes cliniques de la même maladie met en évidence son intérêt en terme nosographique, thérapeutique et surtout pronostique, tant ce dernier est lié aux complications thrombotiques.

5. TRAITEMENT

Options thérapeutiques

La rareté de cette maladie a longtemps conduit à l'emploi de thérapeutiques variées dont l'intérêt potentiel était difficilement évaluable(28).

Les transfusions de concentrés globulaires demeurent indispensables en cas d'anémie importante et/ou mal tolérée mais le dogme de transfuser des culots globulaires décomplémentés est largement remis en question (revue dans (29).

La greffe de moelle osseuse allogénique reste le seul traitement curateur de l'HPN. Malheureusement, peu d'informations sont disponibles dans la littérature. Récemment, les données de 67 cas isolés rapportés et de 2 registres internationaux ont été repris (29). Les 3 indications classiques sont l'aplasie médullaire, les complications thrombotiques répétées et 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 puisque 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% (30, 31).

Enfin un certain nombre de médicaments sont potentiellement utiles dans cette maladie: les immunosuppresseurs (cyclosporine et sérum antilymphocytaire) ont été employés avec succès dans certaines formes très pancytopéniques, les androgènes semblent avoir une certaine efficacité, notamment le danazol. Ces derniers sont néanmoins à l'origine d'un certain nombre d'effets secondaires androgéniques (et contraceptifs chez la femme), qu'il ne faut pas ignorer. Les corticoïdes peuvent rendre service notamment au moment des crises (32).

Un médicament a récemment profondément modifié notre prise en charge de l'HPN : L'Eculizumab. Il s'agit d'un anticorps monoclonal inhibant le complément(33), au cœur de la physio-pathogénie de la maladie. Alexion Pharmaceuticals, société de biotechnologie américaine, a ainsi développé les premiers anticorps monoclonaux ciblant le complément. 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, ce qui permet d'obtenir une inhibition quelque soit la voie d'activation impliquée, 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 CAM, élément clé impliqué dans la lyse érythrocytaire. Par ailleurs, en agissant sur C5 et donc 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.

L'efficacité et la tolérance de l'Eculizumab ont été évaluées dans l'HPN au cours de trois essais cliniques indépendants : une phase II pilote menée chez 11 patients(34, 35) et deux essais de phase III, Triumph incluant 87 patients (36) et Shepherd 97 patients (37). Les 195 patients inclus dans ces trois essais cliniques ont continué à bénéficier de l'Eculizumab au long cours (jusqu'à 4 ans de suivi sous traitement) en participant à un essai d'extension (38). Dans tous les essais, le traitement par eculizumab a été administré par voie intraveineuse selon le même schéma posologique à savoir : une phase initiale avec des injections hebdomadaires de 600 mg pendant quatre semaines puis de 900 mg à la cinquième semaine, suivie d'une phase d'entretien avec des

injections de 900 mg toutes les deux semaines. Par ailleurs, dans tous les essais, les patients ont été vaccinés contre le méningocoque, au moins deux semaines avant la première dose d'Eculizumab.

L'efficacité de cet anticorps a été démontrée dans les 3 études chez les patients atteints d'HPN, entraînant une forte réduction de l'hémolyse et des besoins transfusionnels. Dans l'étude Eculizumab versus placebo l'objectif principal qui était la stabilisation du taux d'hémoglobine en l'absence de transfusion a été obtenu chez près de 50% des patients (21 sur 43 patients traités par Eculizumab) et chez aucun des 44 patients ayant reçu le placebo ($p < 0.001$) (36). Durant l'étude, la médiane de concentrés érythrocytaires transfusés était à 0 chez les patients traités par Eculizumab contre 10 concentrés érythrocytaires dans le groupe placebo ($p < 0.001$). Parmi les patients recevant de l'Eculizumab mais chez lesquels il n'a pas été possible d'obtenir une indépendance transfusionnelle, les besoins en transfusion ont été réduits de plus de 40%. La diminution des besoins transfusionnels chez ces derniers patients, sans obtenir l'indépendance transfusionnelle totale, est le reflet fréquent d'une insuffisance médullaire sous-jacente associée à l'HPN (même de forme hémolytique) et/ou à la persistance d'une hémolyse intravasculaire et/ou à la présence d'une hémolyse extravasculaire.

De manière significative, les patients traités par eculizumab sont moins fatigués (score FACIT-Fatigue) et présentent une amélioration de leur qualité de vie (Echelle EORTC QLQ-C30). Il faut noter que même les patients n'ayant pas atteint une indépendance transfusionnelle pendant le traitement par eculizumab, ont bénéficié, de manière significative, d'une amélioration du score de fatigue et des autres paramètres de qualité de vie. Cette amélioration de la qualité de vie et de la fatigue observée sous eculizumab 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.

D'autre part, en reprenant l'ensemble des malades ayant été traités ($n=195$), l'évaluation des événements thrombotiques permet de démontrer dans cette étude d'extension, une réduction de 85 % du nombre d'événements thrombotiques quand on compare respectivement le taux d'événements sur la période avant traitement au taux d'événements thrombotiques sur la période sous traitement (7,37 événements thrombotiques

pour 100 patients/année versus 1,07 pour 100 patients/année, $p < 0.001$). Une réduction du même ordre de grandeur (92%) est confirmée quand on fait la même analyse sur la population de patients sous antithrombotiques (10,61 événements thrombotiques pour 100 patients/année versus 0,62 pour 100 patients/année, $p < 0.001$). Cette étude montre que le traitement à long-terme par eculizumab réduit de façon importante le risque de complications thrombotiques chez les patients HPN (38).

Indications thérapeutiques

Certaines situations cliniques sont simples. La forme classique, hémolytique, sans cytopénie est une indication non discutable au traitement par Eculizumab. La forme aplasique (syndrome aplasie HPN) doit être considérée avant tout comme une aplasie non HPN avec les conséquences thérapeutiques que cela implique (greffe génoidentique si donneur familial, traitement immunosuppresseur si absence de donneur). Dans la forme aplasique, l'Eculizumab pourra être discuté seulement si cette forme aplasie HPN s'accompagne d'une hémolyse.

Il reste ensuite 2 questions difficiles. La première est la place de l'allogreffe dans cette maladie. Si le cas de l'insuffisance médullaire vient d'être abordé, les deux autres indications reconnues sont les crises hémolytiques sévères récurrentes et les thromboses récidivantes. Cette question reste une affaire de spécialiste ; une étude rétrospective conjointe de la Société Française d'Hématologie et de l'EBMT est en cours et devrait apporter des éléments de réponses. Enfin, la place des anticoagulants est loin d'être claire. Si la mise en place d'un traitement prophylactique par antivitamine K est conseillée par nos confrères anglais en cas de taille du clone $> 50\%$ (plus de 50% de cellules GPI négatives), ce dernier n'est pas recommandé en France du fait du risque hémorragique. En cas de thrombose avérée, il est accepté par tous que le traitement anticoagulant quel qu'il soit n'est en aucun cas protecteur à 100% du risque de récurrence de thrombose. Les données récentes sur le bénéfice potentiel en terme de risque de thrombose pour les patients traités par Eculizumab et l'efficacité non optimale des anticoagulants en font une indication de choix chez les patients ayant des complications thrombotiques, avec là encore une discussion inévitable de l'indication d'allogreffe chez de tels malades. Les indications thérapeutiques sont résumées schématiquement dans la Figure 3.

6. CONCLUSION.

L'HPN reste une maladie rare qui doit être évoquée devant une anémie hémolytique inexpliquée, ce d'autant plus que le patient présente une des deux complications majeures de la maladie, à savoir un événement thrombotique ou une aplasie médullaire. Le diagnostic ne pose guère de problème depuis les progrès de la cryométrie en flux. La physiopathologie de la maladie est maintenant bien connue, ayant permis non seulement de comprendre les signes cliniques de l'HPN, mais aussi et surtout de créer un anticorps monoclonal (Eculizumab) dirigé contre le complément, extrêmement efficace sur l'hémolyse. Sur le plan thérapeutique, la forme classique de la maladie a bénéficié de l'avènement de l'Eculizumab. La forme aplasique est une indication d'allogreffe en cas de donneur géno-identique ou de traitement immunosuppresseur en l'absence de donneur. Les complications thrombotiques répétées, restent, même à l'heure actuelle, des facteurs affectant la survie des patients.

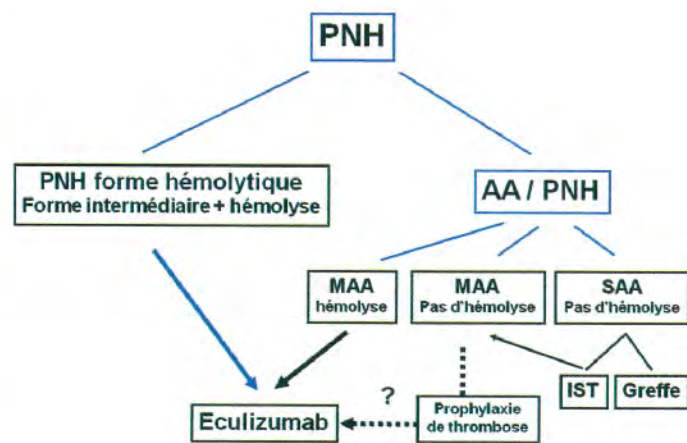


Figure 3 : Schéma de synthèse thérapeutique

BIBLIOGRAPHIE

1. Strubing P. Paroxysmale Haemoglobinurie. Dtsch Med Wochenschr. 1882;8:1-3.
2. Enneking J. Eine neue form intermittierender haemoglobinurie (Haemoglobinurie paroxysmalis nocturnia). Klinische Wochenschrift. 1928;7:2045.
3. 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.
4. Dacie JV, Lewis SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology, and nature of the disease. Ser Haematol. 1972;5:3-23.
5. Rosse WF, Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 1995;86:3277-86.
6. Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Baillieres Clin Haematol. 1989; 1:113-38.
7. Rotoli B, Bessler M, Alfinito F, del Vecchio L. Membrane proteins in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Blood Rev. 1993; 2:75-86.
8. Udenfriend S, Kodukula K. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. Annu Rev Biochem. 1995;64:563-91.
9. Vidugiriene J, Menon AK. The GPI anchor of cell-surface proteins is synthesized on the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum. J Cell Biol. 1994;127:333-41.
10. Yeh ET, Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the glycosylphosphatidylinositol anchor. J Clin Invest. 1994;93:2305-10.

11. Takahashi M, Takeda J, Hirose S, Hyman R, Inoue N, Miyata T, et al. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. J Exp Med. 1993;177:517-21.
12. Miyata T, Takeda J, Iida Y, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, et al. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. Science. 1993;259:1318-20.
13. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Cell. 1993;73:703-11.
14. Miyata T, Yamada N, Iida Y, Nishimura J, Takeda J, Kitani T, et al. Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. N Engl J Med. 1994;330:249-55.
15. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Miyata T, Yamada N, Takeda J, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. Embo J. 1994;13:110-7.
16. Nafa K, Mason PJ, Hillmen P, Luzzatto L, Bessler M. Mutations in the PIG-A gene causing paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are mainly of the frameshift type. Blood. 1995;86:4650-5.
17. Ware RE, Howard TA, Kamitani T, Change HM, Yeh ET, Seldin MF. Chromosomal assignment of genes involved in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis: implications for the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 1994;83:3753-7.
18. Kawagoe K, Takeda J, Endo Y, Kinoshita T. Molecular cloning of murine pig-a, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function, and genetic locus. Genomics. 1994;23:566-74.
19. Luzzatto L, Bessler M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Curr Opin Hematol. 1996;3:101-10.
20. Gladwin MT, Lancaster JR, Jr, Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. Nat Med. 2003;9:496-500.
21. Schnog JJ, Jager EH, van der Dijs FP, Duits AJ, Moshage H, Muskiet FD, et al. Evidence for a metabolic shift of arginine metabolism in sickle cell disease. Ann Hematol. 2004;83:371-5.
22. Carmichael FJ, Ali AC, Campbell JA, Langlois SF, Biro GP, Willan AR, et al. A phase I study of oxidized raffinose cross-linked human hemoglobin. Crit Care Med. 2000;28:2283-92.
23. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. Jama. 2005;293:1653-62.
24. Hugel B, Socie G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. Blood. 1999;93:3451-6.
25. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood Rev. 2007;3:157-71.
26. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 1993;82:1192-6.
27. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. N Engl J Med. 1995;333:1253-8.
28. Rosse WF. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 1982;60:20-3.
29. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 2005;106:3699-709.
30. Kawahara K, Witherspoon RP, Storb R. Marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Am J Hematol. 1992;39:283-8.
31. Saso R, Marsh J, Cevreska L, Szer J, Gale RP, Rowlings PA, et al. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Br J Haematol. 1999;104:392-6.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Hill A, Hillmen P, Richards SJ, Elebute D, Marsh JC, Chan J, et al. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 2005;106:2559-65.
36. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie G, Muus P, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. N Engl J Med. 2006;355:1233-43.
37. 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.
38. Hillmen P, Muus P, Duhrsen 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.

Venofe[®]

Hydroxyde ferrique saccharose

Le fer intraveineux

FORME ET PRESENTATION: Solution injectable en perfusion, par voie IV et en injection dans le dialyseur. Ampoule de 5 ml, boîte de 5. **COMPOSITION:** Fer élémentaire : 20 mg par ml; 100 mg par ampoule; 500 mg par boîte (Sous forme d'hydroxyde ferrique-saccharose). **Excipients:** Hydroxyde de sodium, eau pour préparation injectable. **CLASSE PHARMACO-THERAPEUTIQUE:** Antianémique. **INDICATIONS THERAPEUTIQUES:** Venofer® est indiqué pour le traitement de la carence martiale dans les indications suivantes: • Nécessité clinique d'apport rapide de fer. • Intolérance et non observance du patient à la thérapie martiale par voie orale. • En cas de maladie active inflammatoire de l'intestin, au cours de laquelle les préparations martiales par voie orale sont inefficaces. **CONTRE-INDICATIONS:** Ce complexe hydroxyde ferrique-saccharose pour la voie intraveineuse ne doit pas être utilisé dans les situations suivantes: • surcharge martiale ou troubles de l'utilisation du fer: - hémochromatose primitive, - hémochromatose secondaire, en particulier hémolyse; • éthylisme chronique; • hypersensibilité connue à Venofer® ou à l'un des constituants du médicament. **MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS D'EMPLOI:** • Avant l'administration de ce complexe hydroxyde ferrique-saccharose pour la voie intraveineuse, il est impératif de confirmer biologiquement l'insuffisance de réplétion des stocks endogènes de fer par les mesures de la ferritinémie et de la saturation de la transferrine. • Ce complexe hydroxyde ferrique-saccharose pour voie intraveineuse ne doit pas être utilisé par voie intramusculaire. • Se conformer à une vitesse de perfusion lente pour éviter une hypotension. • Les préparations à base de fer administrées par voie parentérale peuvent causer des réactions allergiques ou anaphylactoïdes. • Venofer® doit être administré avec précaution chez les patients présentant une augmentation marquée de la concentration en ferritine due à une infection aiguë ou chronique, car le fer parentéral peut avoir des conséquences néfastes sur l'infection bactérienne ou virale. • En cas d'antécédents d'asthme, d'eczéma, d'autres allergies atopiques ou de réactions allergiques à d'autres préparations martiales parentérales, ainsi qu'en cas de faible capacité de liaison du fer et/ou de déficit en acide folique; Venofer® est à administrer avec prudence étant donné que ces patients sont particulièrement exposés au risque d'une réaction allergique. Cependant, il a été montré dans une étude portant sur un nombre limité de patients sensibles au fer Dextran que Venofer® pouvait être administré sans complications. • En cas de syndrome inflammatoire chronique, le fer est détourné de l'érythropoïèse au profit des organes de réserve. L'efficacité de cette solution de fer pour voie IV peut être diminuée dans cette situation. • Chez les sujets préalablement traités par le fer par voie orale, ce traitement devra être interrompu 24 heures avant la première injection de Venofer®. **Précautions d'emploi :** Dans la situation pré-opératoire, où la déplétion martiale attendue est limitée dans le temps, la dose totale de fer administré par voie veineuse ne doit jamais dépasser 15 mg/kg. Chez l'insuffisant rénal en dialyse, chez lequel la perte de fer est permanente, le stock de fer endogène doit être régulièrement évalué pour adapter la dose d'entretien de cette solution de fer pour voie IV. Si, à quelque moment que ce soit, des manifestations d'allergie ou d'intolérance sont observées, le traitement doit être arrêté immédiatement. Les préparations à base de fer administrées par voie parentérale peuvent causer des réactions allergiques ou anaphylactoïdes potentiellement létales. Dans ce cas, l'administration doit être interrompue immédiatement. En présence d'une réaction allergique légère, administrer des antihistaminiques; en présence d'une réaction anaphylactoïde grave, administrer de l'adrénaline immédiatement. Des moyens de réanimation cardio-pulmonaire doivent être à disposition. **L'administration durant la Grossesse et l'Allaitement :** **Grossesse :** Les données animales sont rassurantes. En clinique, les données sont limitées au 1^{er} trimestre mais aucun effet malformatif n'a été signalé à ce jour. A ce jour, trois études contrôlées menées sur une centaine de femmes enceintes et une étude contrôlée menée sur une cinquantaine de femmes en post-partum ont montré une accélération de l'érythropoïèse supérieure au fer par voie orale. Venofer® ne doit être utilisé chez la femme enceinte qu'en cas de traitement oral inefficace ou mal toléré et lorsque le degré d'anémie ferriprive est tel qu'il représente un risque pour la mère et l'enfant. **Allaitement :** Il est peu probable que le complexe hydroxyde ferrique-saccharose passe dans le lait maternel. Les études chez l'animal n'ont pas montré d'effets délétères directs ou indirects sur le nouveau-né allaité. **Effets sur l'aptitude à conduire un véhicule ou à utiliser des machines:** Il est peu probable que Venofer® affecte l'aptitude à conduire ou à utiliser des machines. **EFFETS SECONDAIRES / EFFETS ADVERSEs:** Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés avec Venofer® lors des études cliniques ont été les suivants: perturbation transitoire du goût (dysgueusie), hypotension, fièvre, frissons, réactions au site d'injection et nausées. Ces effets sont apparus chez 0,5 à 1,5 % des patients. Très rarement, des réactions graves de type anaphylactique peuvent être observées (collapsus, bronchospasme). Les effets indésirables imputables à Venofer® ayant été rapportés lors des études cliniques sont les suivants: **Troubles du système nerveux:** Fréquent ($\geq 1/100$, $< 1/10$): perturbation transitoire du goût (sensation de goût métallique notamment), Peu fréquent ($\geq 1/1000$, $< 1/100$): céphalées, vertiges; Rare ($\geq 1/10\ 000$, $< 1/1000$): paresthésie, syncope, perte de connaissance, sensation de brûlure. **Troubles cardiovasculaires :** Peu fréquent ($\geq 1/1000$, $< 1/100$): hypotension, collapsus, tachycardie et palpitations. Rarement ($\geq 1/10000$, $< 1/1000$): hypertension. **Troubles respiratoires, thoraciques et médiastinaux :** Peu fréquent ($\geq 1/1000$, $< 1/100$): bronchospasme, dyspnée. **Troubles gastro-intestinaux :** Peu fréquent ($\geq 1/1000$, $< 1/100$): nausées, vomissements, douleur abdominale, diarrhées. **Troubles cutanés et des tissus sous-cutanés :** Peu fréquent ($\geq 1/1000$, $< 1/100$): prurit, urticaire, rash, exanthème et érythème. **Troubles musculéo-squelettiques, du tissu conjonctif et des os :** Peu fréquent ($\geq 1/1000$, $< 1/100$): crampes musculaires, myalgie. **Troubles généraux et accidents liés au site d'injection :** Peu fréquent ($\geq 1/1000$, $< 1/100$): fièvre, tremblements, bouffées de chaleur; douleur et oppression thoracique. Des troubles liés au site d'injection tels qu'une phlébite superficielle, une sensation de brûlure et un oedème sont également rapportés. Rare ($\geq 1/10\ 000$, $< 1/1\ 000$): arthralgie, oedème périphérique, fatigue, asthénie, malaise, sensation de chaleur, oedème. **Affections du système immunitaire:** Rarement ($\geq 1/10\ 000$, $< 1/1\ 000$): réactions anaphylactoïdes. De plus, les effets indésirables suivants ont été rapportés (spontanément) depuis la mise sur le marché de Venofer®: troubles de la conscience, étourdissements, confusion mentale, angio-oedème, gonflement des articulations, hyperhidrose, dorsalgies, bradycardie, chromaturie. **INTERACTIONS MEDICAMENTEUSES:** Déconseillée: • Fer (sels) voie orale: lipothymie, voire choc, attribué à la libération rapide du fer de sa forme complexe et à la saturation de la sidérophiline. **MODE D'EMPLOI ET POSOLOGIE:** **Administration:** Venofer® doit être administré par voie intraveineuse stricte, en injection lente, en perfusion lente ou directement dans le circuit sanguin extra-corporel en hémodialyse. **En injection:** 10ml de Venofer® (200 mg de fer) injecté sur une période d'au moins 10mn. **En perfusion:** La dilution doit être réalisée immédiatement avant la perfusion, exclusivement dans une solution isotonique stérile de chlorure de sodium, à raison de 1 ampoule (correspondant à 100 mg de fer) diluée dans un maximum de 1 l de solution pour perfusion de chlorure de sodium à 0,9 %, jusqu'à 3 ampoules (300 mg de fer) diluées dans un maximum de 3 l de solution pour perfusion de chlorure de sodium à 0,9 %. La solution obtenue sera administrée en perfusion lente avec un débit de 3,5 ml par minute, sans dépasser 3 ampoules (300 mg de fer) par perfusion administrée en au moins 1,5 heures chez l'adulte. Afin d'éviter une administration péri-veineuse, il convient de s'assurer que l'aiguille est bien positionnée dans la veine avant de pratiquer la perfusion. L'extravasation de Venofer® au site d'injection peut en effet provoquer douleurs, inflammation, formation de pigmentation brune définitive de la peau. Etendre le bras du patient après la perfusion. La durée du traitement ne doit pas excéder le temps de restauration des réserves de fer. **Injection dans le circuit sanguin extra corporel pendant une séance d'hémodialyse:** Venofer® peut être administré en milieu de séance d'hémodialyse directement dans le pôle veineux du circuit sanguin extra corporel dans les mêmes conditions que pour une perfusion ou une injection intraveineuse. **Posologie:** La posologie par injection ne doit pas dépasser 300 mg (3 ampoules) par 24h et ne doit pas dépasser 2 x 300 mg par semaine chez l'adulte. La dose totale à administrer et le rythme des injections dépendent du poids, du taux d'hémoglobine, de la ferritinémie basale ou de la perte de fer attendue. **Insuffisance rénale chronique:** • dès lors que sont exprimés des signes biologiques d'insuffisance de réplétion du stock de fer (ferritinémie $< 100\ \mu\text{g/l}$, saturation de la transferrine $< 20\%$), et qu'un sel de fer oral s'avère insuffisant ou mal toléré, • en cas de traitement par érythropoïétine, lorsque les réserves en fer sont insuffisantes pour assurer une réponse érythropoïétique optimale (ferritinémie $< 200\ \mu\text{g/l}$, saturation de la transferrine $< 25\%$), et qu'un sel de fer oral s'avère insuffisant ou mal toléré, • la posologie d'induction recommandée est de 2 à 4 mg/kg de fer par semaine, c'est-à-dire une à deux ampoules (100 à 200 mg) pendant quatre à douze semaines selon l'importance du déficit à combler. • En traitement d'entretien, pour compenser les pertes de fer estimées à 2 à 5 mg par jour, une ampoule (2mg/kg) peut être administrée une ou deux fois par mois. L'évolution du stock de fer doit être régulièrement contrôlée par les mesures de la ferritinémie et du taux de saturation de la transferrine. Calcul de la dose totale nécessaire: La dose de Venofer®, déterminée en fonction du taux d'hémoglobine et du poids corporel, adaptée individuellement en tenant compte du déficit en fer total, peut être calculée selon la formule suivante: - déficit en fer total (mg) = poids corporel (kg) x (Hb cible - Hb actuelle) (g/dl) x 2,4 + réserves de fer (mg); - Au dessous de 35 kg de poids corporel: Hb cible = 13 g/dl et réserves de fer = 15 mg/kg de poids corporel; - Pour 35 kg de poids corporel et plus: Hb cible = 14 g/dl et réserves de fer = 500 mg. *facteur 2,4 = $0,0034 \times 0,07 \times 1000 \times 10$ (contenu de l'Hb en fer $\approx 0,34\%$, volume sanguin $\approx 7\%$ du poids corporel, facteur 1000 = conversion de g en mg, facteur 10 = conversion de l' en dl). **Programme pré-opératoire de don de sang autologue avec érythropoïétine:** • une supplémentation en fer n'est indiquée que si les réserves de fer sont insuffisantes pour compenser la perte de fer attendue: ferritinémie $< 150\ \mu\text{g/l}$. • pour tenir compte du temps nécessaire à l'érythropoïèse, il est souhaitable de débuter le traitement martial au moins deux semaines avant la première soustraction sanguine. • la posologie recommandée est 2 à 3 mg/kg (200 mg chez l'adulte) par semaine pendant cinq semaines. La posologie maximale cumulée ne doit pas dépasser 15 mg/kg. Calcul de la dose totale nécessaire dans le cadre de la transfusion autologue programmée: • si la quantité de sang perdu est connue: l'administration de 2 ampoules de Venofer® (soit 200 mg de fer) permet une augmentation de la concentration en hémoglobine (à 15 g/dl) équivalente à celle obtenue par l'administration d'une unité de sang (soit 4 dl), on en déduit la méthode de calcul suivante: - quantité totale de fer à remplacer [mg] = nombre d'unités de sang perdu x 200; - nombre total d'ampoules de Venofer® à administrer = nombre d'unités de sang perdu multiplié par deux. • si la concentration en hémoglobine est connue: on utilise la formule générale en considérant que, dans ce cas, les réserves de fer n'ont pas besoin d'être restaurées. D'où: quantité totale de fer à remplacer [mg] = poids corporel [kg] x 2,4 x (Hb cible - Hb actuelle) [g/dl]. Exemple: Pour un poids corporel de 60 kg et un déficit en hémoglobine de 1 g/dl, la quantité de fer qui doit être remplacée = 150 mg, c'est à dire 1 ampoule et demi de Venofer® nécessaires dans ce cas. **Anémies aiguës en post-opératoire immédiat chez les patients ne pouvant recevoir d'alimentation orale:** Une supplémentation par fer injectable peut s'envisager lorsque le niveau de l'hémoglobine descend en dessous d'un seuil critique (9 à 10 g/dl chez les sujets à risque, 7 à 8 g/dl chez le sujet normal). La posologie recommandée chez l'adulte est généralement de 100 à 200 mg par injection, 1 à 3 fois par semaine, en respectant un intervalle de 48 heures entre chaque injection. Chez l'enfant, elle est de 3 mg/kg de poids corporel par injection, 1 à 3 fois par semaine, en respectant un intervalle de 48 heures entre chaque injection. La dose injectée ne doit pas dépasser la dose totale calculée selon la formule suivante: Déficit en fer total (mg) = poids corporel (kg) x (Hb cible - Hb actuelle) (g/dl) x 2,4. **Anémies liées aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin:** Une supplémentation par Venofer® peut être envisagée lorsque le niveau de l'hémoglobine descend en dessous de 10,5 g/dl. La posologie recommandée chez l'adulte est généralement de 100 à 200 mg par injection, 1 à 3 fois par semaine, en respectant un intervalle de 48 heures entre chaque injection. Calcul de la dose totale nécessaire: La dose de Venofer®, déterminée en fonction du taux d'hémoglobine et du poids corporel, adaptée individuellement en tenant compte du déficit en fer total, peut être calculée selon la formule suivante: - Déficit en fer total (mg) = poids corporel (kg) x (Hb cible - Hb actuelle) (g/dl) x 2,4 + réserves de fer (mg); - Au-dessous de 35 kg de poids corporel: Hb cible = 13 g/dl et réserves de fer = 15 mg/kg de poids corporel; - Pour 35 kg de poids corporel et plus: Hb cible = 14 g/dl et réserves de fer = 500 mg. *facteur 2,4 = $0,0034 \times 0,07 \times 1000 \times 10$ (contenu de l'Hb en fer $\approx 0,34\%$, volume sanguin $\approx 7\%$ du poids corporel, facteur 1000 = conversion de g en mg, facteur 10 = conversion de l' en dl). **SURDOSAGE:** Des cas de surcharge aiguë en fer ont été rapportés avec la voie injectable intramusculaire. La symptomatologie peut comporter: nausées, vertiges, hypotension, malaise, tachycardie, érythème, voire état de choc. Un surdosage peut causer une surcharge martiale responsable d'hémochromatose. C'est la raison pour laquelle il est recommandé de ne jamais dépasser une dose totale de 15 mg/kg. Une attention toute particulière est requise afin d'éviter une surcharge en fer en cas de non-réponse au traitement d'une anémie incorrectement diagnostiquée comme étant une anémie hypochromique. En cas d'ingestion accidentelle ou volontaire de cette solution de fer réservée à la voie intraveineuse, la symptomatologie comporte des signes d'irritation intense ou de nécrose des muqueuses digestives entraînant: douleurs abdominales, vomissements, diarrhée souvent sanglante pouvant s'accompagner d'état de choc avec insuffisance rénale aiguë, atteinte hépatique, coma souvent convulsif. A distance de l'intoxication, des sténoses digestives sont possibles. Le traitement doit intervenir le plus tôt possible en réalisant un lavage gastrique avec une solution de bicarbonate de sodium à 1 %. En cas de surcharge martiale, les patients doivent être traités en administrant un agent chélateur du fer, le plus spécifique étant la déféroxamine, principalement lorsque la concentration en fer sérique est supérieure à 5 $\mu\text{g/ml}$. L'état de choc, la déshydratation et les anomalies acido-basiques seront traités de façon classique en milieu spécialisé. **INSTRUCTIONS ET MODALITES DE MANIPULATION:** Venofer® ne doit être dilué que dans une solution stérile de chlorure de sodium à 0,9 % et ne doit être mélangé avec aucun autre solvant ou agent thérapeutique du fait des risques de précipitation ou d'interactions. La compatibilité de la solution diluée est connue seulement avec des récipients en verre ou en PVC. Il convient d'inspecter visuellement les ampoules avant emploi. N'utiliser que des ampoules contenant une solution homogène, sans aucun signe de sédimentation. **CONDITIONS PARTICULIERES DE STOCKAGE ET DE CONSERVATION:** À conserver dans son emballage original à une température inférieure à 25°C et à l'abri de la lumière. Ne pas congeler. Durée de conservation: 3 ans. **CONDITIONS PARTICULIERES DE DISPENSATION:** Médicament sur ordonnance. **TITULAIRE DE L'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE:** Vifor (International) SA. St. Gallen / Suisse. **SITES DE FABRICATION:** Altana Pharma AG Constance / Allemagne. Impfstoffwerk Dessau-Tomau GmbH. Rodleben / Allemagne. **IMPORTATEUR:** Abdi Ibrahim Algérie. Dar Diaf - Chéraga, Alger. **DECISION NUMERO D'ENREGISTREMENT:** 07/12 E 135/393. **DATE DE REVISION DE LA NOTICE:** 24.06.2008

L'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE (HPN) DANS SA FORME HEMOLYTIQUE A PROPOS DE 07 CAS

F..Tensaout ; N.Boudjerra ; F.Boukhemia ; N.Abdennebi ; N.Ait Amer ; F.Harieche ; F.Belhadri ; F.Zerhouni ; RM.Hamladji

Service hématologie-Greffe de moelle osseuse, Centre Pierre et Marie Curie, Alger

INTRODUCTION

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est une maladie acquise et clonale de la cellule souche hématopoïétique due à une mutation somatique entraînant une perte fonctionnelle majeure ou même totale du gène PIGA (phosphatidyl inositol glycane de classe A) situé sur le chromosome X, impliqué dans la synthèse du Glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) (1). Le GPI est lui-même nécessaire à l'ancrage membranaire de plusieurs protéines en particulier du CD59 : membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL) et CD55 : Decay accelerating factor (DAF), qui sont deux protéines de surface des cellules sanguines (leucocytes, monocytes et surtout globules rouges) qui inhibent au niveau des hématies la constitution du complexe d'attaque membranaire du complément. Le déficit en facteur de protection CD55 et CD59 à la surface des hématies est à l'origine de l'hémolyse intra-vasculaire caractéristique de la maladie en raison d'une sensibilité anormale à l'action lytique du complément (2). Le diagnostic repose sur la cytométrie en flux méthode la plus sensible et la plus spécifique tant sur le plan quantitatif, que sur le plan qualitatif. L'HPN est caractérisée par un polymorphisme clinique : la forme hémolytique classique qui est la forme la plus rare se manifestant par un tableau d'hémolyse intra vasculaire sans signe de maladie médullaire et la forme hémolytique accompagnant ou survenant après une maladie médullaire notamment l'aplasie médullaire traitée par immunosuppresseur. Ces formes hémolytiques sont émaillées d'accidents thrombotiques estimés à 30% en dix ans (4).

Le pronostic des formes hémolytiques dépend de la fréquence et de la sévérité des poussées hémolytiques et surtout des complications thrombotiques en raison de leur nombre et de leur site (système nerveux central, abdominale : syndrome de Budd Chiari). L'étude de la société française d'Hématologie a intéressé un grand nombre de malades ce qui a permis d'individualiser les facteurs de risques associés à la survie dans la forme classique : l'âge > 40 ans, le fait de ne pas avoir été traité par

androgènes apparaissent comme délétères, ainsi que l'évolution vers une aplasie médullaire (7).

Les traitements classiques longtemps utilisés s'avèrent décevants, les transfusions de concentrés globulaires demeurent indispensables en cas d'anémie importante (4). Un certain nombre de médicaments sont potentiellement utiles: les androgènes semblent avoir une certaine efficacité de même que le Danazol et les corticoïdes (7) et la mise sous anticoagulants en cas de thrombose (4). Sur une période de 05 ans (2005 à 2009), 56 cas d'HPN ont été diagnostiqués dans notre service par cytométrie en flux, 7 cas (12%) présentent une forme d'HPN hémolytique. Nous rapportons dans ce travail les 7 cas d'HPN présentant une forme hémolytique après un délai moyen de suivi de 53 mois (31-75 mois) : les caractéristiques clinico-biologiques, les complications et les résultats du traitement sont les suivants :

1-CARACTÉRISTIQUES CLINIQUES :

L'âge moyen des 7 patients (pts) est de 32 ans (24 - 53 ans), dont 5 pts sont âgés de moins de 30 ans, le sex-ratio = 2,5, le délai diagnostic moyen de 37 mois (4-127), le symptôme révélateur est l'anémie chronique dans 5 cas ou survenue au cours du suivi d'une aplasie médullaire sévère (AMS) traitée par immunosuppresseur (IS) dans 2 cas. Un état général conservé et une pâleur cutanéomuqueuse (PCM) sont retrouvés chez tous les patients, un subictère conjonctival et la notion d'urines foncées chez 5 pts et des douleurs lombaires chez un patient (Tableau I)

Patient N°	Age	sexe	Délai diagnostic (mois)	Circonstances DC	ECOG 1-2	PCM	Subictère conjonctival	SPM	Urines foncées	Douleurs abdominales
1	38	M	4	Anémie chronique	+	+	+	-	+	-
2	53	M	12	" "	+	+	+	+	+	-
3	28	M	36	" "	+	+	+	-	+	-
4	29	M	24	" "	+	+	+	-	+	+
5	24	M	24	" "	+	+	-	-	+	-
6	24	F	36 (sous IS)	Anémie hémolytique après AMS traitée par IS	+	+	+	-	-	-
7	29	F	127 (après arrêt des IS)	" "	+	+	-	-	-	-

Tableau I : Caractéristiques cliniques

2-CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES :

- Signes hématologiques et biochimiques :

La triade hémolytique biologique est retrouvée chez tous les pts avec un taux moyen d'Hémoglobine de 6,2 g/dl (3,8 et 7,9), le taux de plaquettes est normal chez tous les pts. Une leucopénie modérée a été observée chez deux patients (pts N° 6 et 7), la triade hémolytique biologique et l'élévation du taux de LDH sont observées chez tous les patients (Tableau II)

Patient N°	Hb (g/dl)	HGM (l)	CCMkn	GB	PLQ	Réticulocytes	W (mg/l)	LDH (u/l)
1	5.5	91	32	4200	154000	184000	25	3680
2	3.8	113	32	5600	150000	132000	38	1167
3	6.4	76	28	7600	298000	150000	28	5540
4	6.1	93	32	8300	178000	149000	23	706
5	7.9	93	32	9100	483000	170000	33	2150
6	6.8	93.5	32	3600	201000	153000	20	3030
7	7.1	88.7	32.4	3000	159000	185400	22	4090

Tableau II : Signes hématologiques et biochimiques

- Cytométrie en flux :

Le clone HPN de type II a été retrouvé chez 5pts et le type III chez 2pts, la taille du clone HPN sur les globules rouges et sur les globules blancs est en moyenne de 47,7% (5 - 87%) et 73.2% (10-97) respectivement (Tableau III)

	Type	GR	GB
N°1	II	NP	75%
N°2	II	5%	10%
N°3	II	87%	97%
N°4	III	NP	90%
N°5	II	47%	96%
N°6	III	52%	95%
N°7	II	52%	50%

Tableau III : Type et pourcentage du clone HPN analysés en cytométrie en flux

3-TRAITEMENT ET ÉVOLUTION / COMPLICATIONS :

Sur une période de 57 mois (de mars 2005 à décembre 2009) : Une poussée d'hémolyse aiguë est observée chez 6/7 pts (85,7%) avec une moyenne de 3 épisodes /an/patient (2-10) ayant nécessité des transfusions. Le nombre moyen de culots globulaires transfusés par patient est de 19 (5 à 66). Une forme hémolytique chronique modérée chez une patiente n'a pas bénéficié de transfusion. Parmi les 7 patients à forme hémolytique, 3 patients ont présenté des épisodes thrombotiques : un syndrome de Budd Chiari au moment du diagnostic, un cavernome portal à 59 mois et une thrombose spléno-portale à 60 mois. Un patient a évolué en aplasie médullaire (AM) après un suivi de 31 mois (patient N° 2 : clone HPN à 10%). Les complications infectieuses à répétition (ORL, broncho-pulmonaires et digestives) sont observées chez 6 pts (85,7%) avec une moyenne d'épisodes infectieux/an / patient de 3 (1 – 5), une insuffisance rénale aiguë (IRA) après crise hémolytique ayant nécessité une hémodialyse est survenue dans 2 cas et des douleurs abdominales récidivantes chez 5 pts (70%) (tableau IV).

Patient n°	Crise hémolytique nb/an	Nb CG Transfusés s/pt	thromboses	IRA	Douleurs abdominales	Infections nb d'épisodes /an	AM
1	3	12	-	-	+	3	-
2	10	66	-	-	-	5	+
3	3	18	-	2 épisodes (hémodialyse)	+	2	-
4	2	7	Sd de Budd-Chiari	-	+	4	-
5	2	5	Spléno-portale	1 épisode (hémodialyse)	+	2	-
6	2	6	Cavernum portal	-	+	1	-
7	0	0	-	-	-	-	-

Tableau IV : Complications

(CG : Culot globulaire, IRA : Insuffisance rénale aiguë, AM : Aplasie médullaire)

Les 7 pts ont été traités par des androgènes (Danazol) à la dose de 10 mg/kg/j en continu, associés au moment des crises hémolytiques aux corticoïdes à raison de 0,5 à 1 mg/kg/j, ainsi que les transfusions sanguines et un traitement anticoagulant (antivitamine K) en cas de thromboses ; le tableau V représente les résultats thérapeutiques par les androgènes.

	Nombre	Bonne réponse HB= 9-13 g/dl	Réponse partielle HB= 7-9 g/dl	Echec
Nilevar	1	1	0	0
Danazol	6	3	2	1 (pt N°2)
Total	7	4 (57%)	2 (29%)	1 (14%)

Tableau V : Résultats de l'androgénothérapie chez les 7 patients atteints de forme d'HPN hémolytique.

4-DISCUSSION :

La cytométrie en flux nous a permis de poser le diagnostic chez tous les patients malgré le délai diagnostic très variable. Tous les patients ont été traités, par des androgènes (Danazol) à la dose de 10 mg/kg/j en continu, associés au moment des crises hémolytiques aux corticoïdes à raison de 0,5 à 1 mg/kg/j et des transfusions sanguines. Au cours du traitement sur un délai moyen de suivi de 53 mois (31 à 75), 4 bonnes réponses sont persistantes, 2 rechutes ont été observées et un échec aux androgènes. Des poussées hémolytiques ont été observées chez 6 pts (85.7%) compliquées d'une insuffisance rénale aiguë ayant nécessité une hémodialyse dans 2 cas, un accident thrombotique (syndrome de Budd- Chiari, un cavernome portal et thrombose spléno-portale) chez 3 pts (42,8% versus 30% de la série française) (12) chez lesquels le clone HPN est > 50% (Pts N° 4, 5 et 6), des douleurs abdominales récidivantes chez 5 pts (70%), des infections récurrentes chez 5 pts (70%) et une évolution vers une aplasie médullaire chez un patient.

Le traitement androgénique n'a pas empêché la survenue d'épisodes hémolytiques aigus graves et thrombotiques. Le traitement préventif par anticoagulant peut se discuter chez 3/7 de nos patients (clone HPN >50%) (13) en sachant que même après thrombose le traitement anticoagulant ne permet pas toujours de prévenir un nouvel épisode thrombotique (11).

Le traitement par Eculizumab qui est un anticorps monoclonal anti est indiqué chez les patients présentant une forme hémolytique pour réduire la dépendance transfusionnelle (8-9) et

pour prévenir les accidents de thrombose (10-11), cependant son coût très élevé est un obstacle majeur à son utilisation.

L'indication de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui est en fait le seul traitement curatif de la maladie (5-6) est généralement indiquée dans le cas d'épisodes hémolytiques répétés graves et en cas de thromboses, cette indication mérite d'être envisagée chez 4 de nos patients ayant un donneur génodentique en raison de la non disponibilité de l'Eculizumab.

BIBLIOGRAPHIE

1. Rosse WF, Ware RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 86: 3277-86.
2. Luzzatto L, Bessler M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin hematol* 1996; 3: 101-10.
3. De latour RP, 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.
4. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R et al. diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699-709.
5. Kawahara K, Witherspoon RP, Storb R, Marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. 1992; 39: 283-8.
6. Saso R, Marsh J, Cenreska L, Szer J, Gale RP, Rowlings PA, et al : Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br J Haematol* 1999; 104: 392- 6.
7. Socié G, Mary JY, de Gramont A, Rio B, Leporrier M, Rose C, et al. paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *French society of Haematology. Lancet* 1996: 348-573-7.
8. 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.
9. Hill A, Hillmen P, Richards SJ, Elebute D, Marsh JC, Chan J, et al. sustained response and long-term safety of Eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 2559-65.
10. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrenzenmeier 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.
11. Hillmen P, Muus P, Duhrsen 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.
12. Hémoglobinurie paroxystique nocturne: G-Socié mise à jour EMC Hématologie 2010- 13- 006- D- 25.
13. Hall C, Richard s, Hillmen p. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria *Blood* 2003; 102:3587-3591.

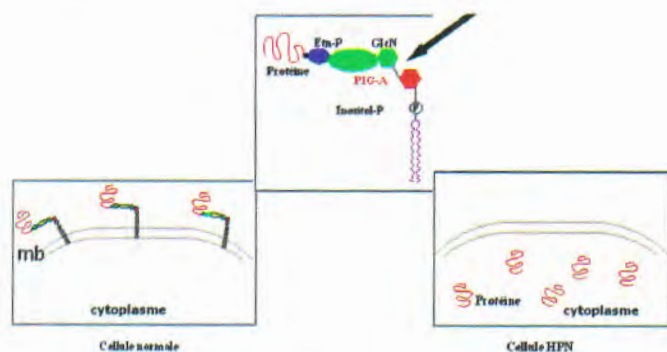
APPLICATION DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX AU DIAGNOSTIC DE L'HÉMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE (HPN)

F.Hariche, M.Benakli, F.Mehdid, N.Abdennebi, F.Boukhemia, R.AhmedNacer, F.Zerhouni, R.M.Hamladji

Service hématologie-Greffe de moelle osseuse, Centre Pierre et Marie Curie, Alger

I-INTRODUCTION

L'HPN est la conséquence de l'expansion clonale et non maligne d'une ou plusieurs cellules souches hématopoïétiques [1,2] ayant acquis une mutation somatique du gène Phosphatidylinositol Glycane de classe A (PIG-A) situé sur le bras court de chromosome X (Xp22). [3,4]. Ce gène est impliqué dans la première étape de biosynthèse d'une protéine d'ancrage la glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) ; il en résulte un défaut d'expression total (absence d'expression) ou partiel (expression insuffisante) de toutes les protéines dont l'expression nécessite cette ancre GPI (ce sont les protéines GPI ancrées) dans toutes les cellules dérivées de cellules souches hématopoïétiques mutées. [5,6] (Figures 1 et 2).



Figures 1 : Ancre GPI et protéines GPI ancrées.

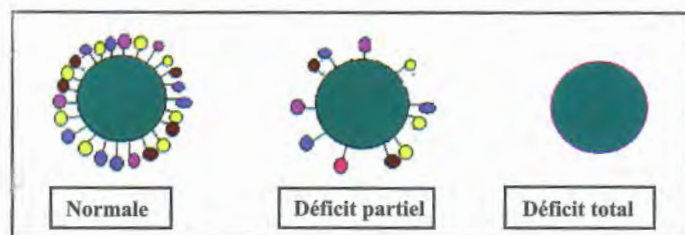


Figure 2 : Différents types de déficits en protéines GPI ancrées.

Parmi les protéines GPI- ancrées (tableau I), 2 protéines régulatrices du complément, CD55 : DAF (Decay Accelerating factor) et le CD59 : MIRL (Membrane Inhibitor of reactive Lysis)

font défaut à la surface du globule rouge [7]; ce déficit est responsable d'une hémolyse intra vasculaire caractéristique de la maladie qui en est la conséquence la plus dramatique.

Protéines du complément	DAF CD55 MIRL CD59
Enzymes	Acétylcholinestérase (GR) Phosphatases alcalines (GB) 5'exonuéotidase (lympho)
Récepteurs	Fcg-type III (CD16a) Récepteur LPS bactériens (CD14) Récepteur à l'urokinase
Autres protéines	CD24, CD66b, CD67 ...

Tableau I : Protéines GPI déficientes dans l'HPN.

L'HPN est caractérisée par la coexistence chez la majorité des patients, de cellules normales et de cellules mutées (le clone HPN) [8, 9,10]. L'importance relative du clone HPN et de l'hématopoïèse normale est variable d'un patient à l'autre (et même chez le patient lui-même durant l'évolution de sa maladie) et semble conditionner l'expression clinique de la maladie.

En effet, Le polymorphisme clinique de la maladie est très important ; elle s'exprime dans une triade symptomatique : anémie hémolytique, thrombose veineuse et cytopénies sanguines.[11]

Le diagnostic de l'HPN repose aujourd'hui sur la mise en évidence d'une population déficitaire en molécules GPI ancrées, par cytométrie en flux (CMF) qui est devenue depuis 1996 la méthode de référence pour le diagnostic de l'HPN car plus sensible et plus spécifique que les tests classiques de Ham-Dacie et de sucrose actuellement abandonnés. [12, 13,14]

Nous avons mis au point dans notre laboratoire un protocole de cytométrie en flux 2 couleurs pour la détection des clones HPN et l'avons appliqué à une série de patients. Nous en rapportons ici les résultats.

II- PATIENTS ET METHODES

1- Patients

De juillet 2005 à décembre 2009, 171 patients ont été screenés par cytométrie en flux à la recherche d'un clone HPN. Il s'agit de :

- 110 patients avec aplasie médullaire acquise : 60 d'entre eux (54,5%) traités auparavant par immunosuppression.
- 24 patients avec un syndrome myélodysplasique (MDS): 20 cytopénies réfractaires avec dysplasie multilignée et 4 anémies réfractaires.
- 12 patients avec anémie hémolytique à Coombs direct négatif.
- 10 patients avec thromboses des veines sus-hépatiques.
- 15 patients avec anémie de Fanconi servant de population témoin négative.

Les caractéristiques des patients sont regroupées dans le tableau II.

Caractéristiques	A.M	MDS	AH Coombs -	Thromboses	A. Fanconi
Nombre	110 50 IS- 60 IS+	24 20 RCMD 4 AR	12	10	15
Age Médiane [intervalle]	23 [6-62]	31 [19-76]	30 [21-57]	39 [19-40]	12 [6-26]
Sexe h/f (Ratio)	53/57 (0,92)	14/8 (0,35)	2/10 (0,2)	4/6 (0,66)	8/7 (1,14)

Tableau II : Caractéristiques des patients screenés.

2- Méthodes.

Pour tous les patients, 3 populations cellulaires ont été étudiées : érythrocytaire, granulocytaire et monocyttaire.

- Pour l'analyse de l'expression des molécules GPI ancrées sur les globules rouges, nous avons utilisé le CD55-PE, le CD59-PE avec le CD235a (antiglycophorine A)-FITC comme Ag non GPI-ancré pour identifier spécifiquement (fenêtrer) les GR.
- Pour l'analyse de l'expression des molécules GPI ancrées sur les granuleux, nous avons utilisé le CD16-FITC, le CD66b-FITC avec le CD33-PE comme Ag non GPI ancré pour cibler les polynucléaires neutrophiles.
- Pour l'analyse de l'expression des molécules GPI ancrées sur les monocytes, nous avons utilisé le CD14-FITC avec le CD33-PE pour cibler les monocytes.

2.1- Echantillons biologiques:

- Les prélèvements sont représentés par du sang total recueilli sur EDTA 0.34M et traité le jour même.
- l'analyse des GR doit être effectuée avant toute transfusion ou au minimum 1 mois après ; car la transfusion augmente la proportion de cellules normales et dilue le clone HPN.

2.2- Procédures de marquage :

➤ Le marquage des érythrocytes est effectué après incubation dans 2 tubes d'une suspension de GR du patient diluée au 1/50ème dans du PBS avec 20 µl de CD235a/ CD55 et CD235a/CD59, pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

2 lavages sont effectués dans du PBS et le culot est resuspendu dans 1 ml de PBS.

➤ Le marquage des granuleux et des monocytes est réalisé après incubation dans 3 tubes de 100 µl de sang total avec 20 µl de CD33/CD16 ou CD33/CD66b et CD33/CD14 pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

Les GR sont lysés avec 2 ml de FacsLysing(BD) solution diluée au 1/10ème pendant 10 minutes à l'abri de la lumière

Après 2 lavages dans 2ml de PBS, le culot cellulaire est resuspendu dans 500 µl de PBS.

2.3- Stratégie de fenêtrage « gating » :

➤ Analyse des érythrocytes. (Figure 3)
Les graphes a et d représentent une population normale de GR exprimant le CD55 et le CD59. Les graphes b et e représentent une population de GR déficiente en CD55 et en CD59 (pointée avec une flèche rouge) coexistant avec une population normale. Ces populations sont ensuite projetées sur des histogrammes mono paramétriques CD55 seul (graphe c) ou CD59 seul (graphe f) afin de quantifier et de typer le déficit : clone HPN à 43% type III dans cet exemple.

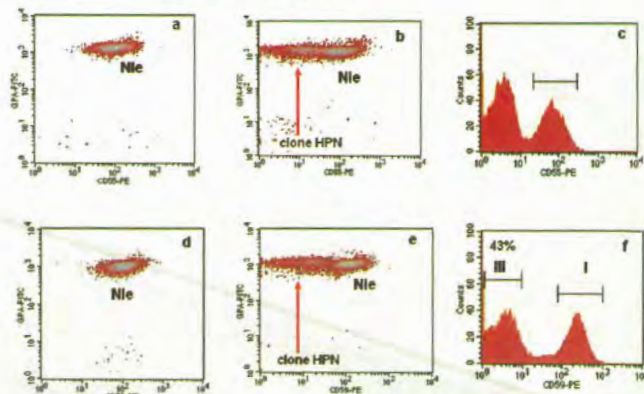


Figure 3 : Analyse des érythrocytes par CMF.

➤ analyse des PN et des monocytes.

Le CD33 est exprimé à la fois sur les PN et sur les monocytes avec des intensités de fluorescence variables (plus forte sur les monocytes) et son utilisation sur un graphe CD33 vs Structure, permet de séparer spécifiquement et dans chaque tube ces deux populations cellulaires. La figure 4 montre un exemple de la stratégie de fenêtrage utilisée pour l'analyse d'un échantillon de sang total marqué avec de CD33 /CD66b et du CD33/CD14.

Un double fenêtrage est effectué pour les PN et les monocytes afin de cibler spécifiquement ces 2 populations cellulaires : rouge pour les granuleux, verte pour les monocytes.

- le 1^{er} fenêtrage est morphologique et est réalisé sur un scattergramme taille/structure (graphe a1) : les données de ce graphe sont indépendantes du marquage des cellules. Il permet d'exclure les éventuels débris cellulaires produits par la lyse de GR et de séparer les différentes populations cellulaires présentes dans un échantillon biologique en fonction de 2 caractéristiques morphologiques : la taille de la cellule (sur l'axe des X) et la structure (sur l'axe des Y). Ainsi, dans un échantillon sanguin normal, 3 populations cellulaires sont clairement individualisées :

- les lymphocytes (en noir sur le graphe) : c'est une population homogène de cellules de petite taille et sans aucune complexité structurale ; elles se positionnent en bas à gauche dans le graphe.
- les polynucléaires neutrophiles (PN) en rouge sur le graphe). Ils représentent une population hétérogène de grandes cellules ayant une structure interne très complexe ; segmentation des noyaux, nombreuses granulations intracytoplasmiques... qui se positionne en haut à droite dans le graphe.
- les monocytes (en vert) : population intermédiaire qui se positionne entre les PN et les lymphocytes, car plus grande que les lymphocytes et de structure interne moins complexe que celle des PN.

3 régions ou fenêtres sont donc tracées autour de ces 3 populations cellulaires.

Les événements contenus dans ces régions sont ensuite projetés sur un scattergramme CD33 vs structure (graphe a2) et 3 autres fenêtres

sont établies pour définir les PN, les monocytes et les lymphocytes en fonction de l'intensité d'expression du CD33 : très forte pour les monocytes (103 sur l'échelle logarithmique), moyenne pour les PN (102 sur la même échelle) et nulle pour les lymphocytes (100-101) ; c'est le fenêtrage immunologique.

Finalement, les PN et les monocytes (doublement définis par le fenêtrage morphologique et immunologique) sont analysés individuellement pour l'expression du CD66b et du CD14 respectivement.

➤ les PN normaux montrent un marquage très fort au CD66b (102-103 sur l'échelle logarithmique graphe b1), alors que le clone HPN montre un marquage plus faible (100-101 sur le même plot).

Ces données peuvent être conditionnées uniquement sur la population des PN (c.à.d que seuls les PN vont apparaître sur les scattergrammes) et représentées soit :

Sous forme d'histogramme monoparamétrique ou 1 seul paramètre de fluorescence sera examiné (graphe b2) ce qui permet de définir le type de déficit : type I, II, ou III.

Soit sous forme de scattergramme bi paramétrique ou 2 paramètres de fluorescence seront examinés : CD33 et CD66b (graphe b3) ce qui permet de quantifier la proportion de cellules déficitaires donc la taille du clone HPN. Un clone HPN est une population de PN CD33+/CD66b-, localisée dans le cadran supérieur gauche estimée à 90% dans cet exemple.

➤ la même stratégie est appliquée aux monocytes : le marquage des monocytes normaux au CD14 est très fort (graphe c1) 103-104 sur l'échelle logarithmique du graphe alors que le marquage des monocytes du clone est beaucoup plus faible en raison du déficit (101-102).

La projection de ces cellules sur le scattergramme biparamétrique CD33/CD14 (graphe c2) conditionné sur les monocytes (c.à.d que seuls les monocytes en vert vont apparaître sur le graphe) isole le clone HPN qui se définit comme une population de monocytes CD33+/CD14- localisée dans le quadrant supérieur gauche du graphe estimé à 25% dans cet exemple.

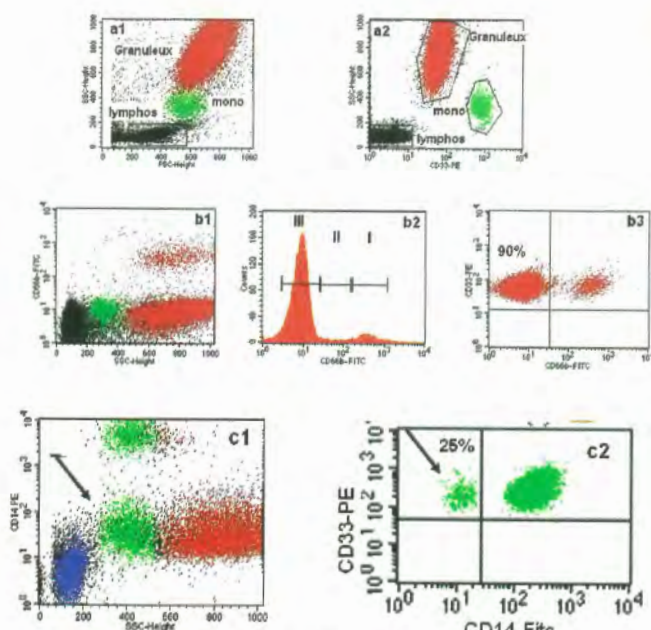


Figure 4 : Stratégie de gating des granuleux (en rouge) et des monocytes (en vert).

2.4- Expression et interprétation des résultats.

- Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules négatives ce qui permet d'estimer la taille du clone et en moyenne d'intensité de fluorescence ce qui permet de définir le degré du déficit : déficit total (HPN III), déficit partiel (HPN II) ou absence de déficit (HPN I).

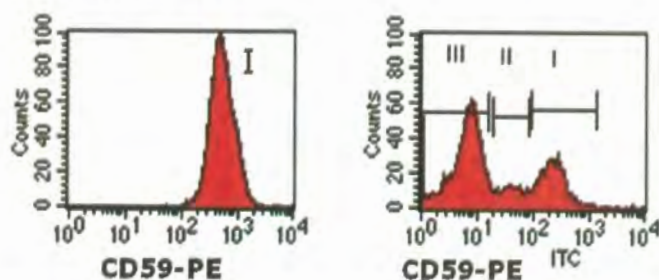


Figure 5 : Différents types de déficits représentés sous forme d'histogrammes.

Cellules normales (type I) graphe de gauche

Cellules de type I, type II (déficit partiel), Type III (déficit total) graphe de Droite.

- un clone HPN est défini par la présence d'une population déficiente en au moins 2 molécules GPI ancrées dans 2 populations cellulaires différentes.

- Un déficit est considéré comme significatif lorsque le pourcentage de cellules négatives est supérieur à 5%.

III- RESULTATS

Nous avons détecté un clone HPN chez 56/171 patients testés (32,7%), il s'agit dans tous les cas d'adultes dont :

- 41/110 (37%) de patients avec aplasie médullaire :

- 29/60 (48%) des aplasies traitées par immunosuppression

- 12/50 (24%) des aplasies n'ayant pas reçu de traitement immunosuppresseur

- 6/12 (50%) des anémies hémolytiques à Coombs négatif

- 5/24 (21%) des syndromes myélodysplasiques (2 Anémies réfractaires et 3 cytopénies réfractaires avec dysplasie multi lignée)

- 4/10 (40%) des patients avec thromboses des veines sus-hépatiques.

Aucun clone HPN n'a été détecté chez les 15 patients avec anémie de Fanconi.

-Le déficit est partiel chez la quasi totalité des patients : 51/59 (91%) il est total chez seulement 5 patients (9%) ; il s'agit de 1 patient avec anémie réfractaire, 2 patients avec aplasie médullaire et 2 patients avec thromboses des veines sus-hépatiques.

Ces résultats sont résumés dans le tableau III.

	Clone HPN		Taille clone %		Type de déficit
	Nb	%	Médiane	(intervalle)	
AM (n=110)	41	(37)	22	(7- 41)	Type II Type III (2 IS-)
IS+ (n=60)	29	(48)	35	(10 - 40)	
IS- (n=50)	12	(24)	18	(7 - 41)	
MDS (n=24)	5	(21)	38	(18 - 56)	Type II Type III (1Pt)
2 AR, 3RCMD					
AH Coombs neg (n=12)	6	(50)	75	(10 - 96)	Type II
Thromboses (n=10)	4	(40)	80	(58- 98)	Type II Type III (2)
A.F (n=15)	0				
Total (n=171)	56	(32,7)			Type II (91%) Type III (9%)

Tableau III : Résultats de l'analyse en CMF pour les différentes catégories de patients de la série.

- La taille du clone HPN estimée sur les érythrocytes est en moyenne de 30%. (Intervalle 0-96%) et reste très largement inférieure a celle estimée sur les granulocytes et les monocytes : moyenne 75% (intervalle 7-98%) (tableau IV).

Taille du clone HPN (%)	Erythrocytes	PN/Monocytes
Moyenne	30	75
Intervalle	6 - 96	7 - 98

$p = 0,02$

Tableau IV : Résultats de l'estimation de la taille du clone HPN sur les différentes populations cellulaires.

IV- DISCUSSION

- Notre protocole de cytométrie en flux 2 couleurs nous a permis de détecter des clones HPN chez 32,7% des patients testés, et ce, de façon spécifique, comme en témoigne l'absence de clone HPN chez les patients ayant une Anémie de Fanconi qui représente notre population témoin négative. Le déficit est presque toujours de type II (91%) des cas et seulement 9% des patients ont un déficit total (type III).

- La taille du clone HPN, estimée sur la population érythrocytaire est largement inférieure à celle estimée sur la population granuleuse et monocyttaire avec une moyenne de 30% vs 75% respectivement. Cette différence est significative ($p=0.02$) et s'explique d'une part, par le fait :

➤ Que les globules rouges du clone « malade » ont une durée de vie courte, puisque détruits par hémolyse, et d'autre part,

➤ la présence d'hématies normales apportées par les transfusions récentes qui dilue le clone et réduit significativement l'aptitude des tests à détecter les GR HPN.

L'analyse seule des GR sous estime donc la taille du clone HPN.[15]

L'analyse des PN et des monocytes apporte une information plus précise sur la taille du clone (surtout en situation d'hémolyse ou après une transfusion récente) car la durée de vie de ces cellules est normale ; cette analyse est aujourd'hui obligatoire pour établir le diagnostic de l'HPN. Cependant, les neutropénies sévères rencontrées chez certains patients (notamment dans les aplasies médullaires sévères) rendent cette approche très difficile surtout lorsque les clones sont de petite taille [16].

Compte tenu du rôle historique des GR dans le diagnostic de l'HPN, la plus part des approches en cytométrie en flux continuent à inclure le

marquage des GR des patients avec le CD55 et le CD59 [17, 18].

En raison de leur longue durée de vie, les lymphocytes ne constituent pas une bonne population cible pour la détection des clones HPN et seuls les lymphocytes qui émergent après l'installation de la maladie vont être déficitaires en molécules GPI ancrées ; la majorité des lymphocytes vont donc exprimer normalement ces molécules alors que les monocytes, les PN et les GR ne les expriment pas. Leur analyse n'est donc pas recommandée [16].

- L'aplasie médullaire et l'HPN sont souvent retrouvées chez le même patient [19]. Cette présentation est souvent appelée le syndrome « aplasie-HPN » ou « forme aplasique ». il semblerait que l'expansion du clone HPN est elle-même liée à un avantage de croissance qui s'explique par un processus auto-immun exerçant un contrôle sélectif négatif vis-à-vis des cellules hématopoïétiques normales [20].

Dans notre série, 46/56 (82%) des cas d'HPN diagnostiqués, l'ont été dans un contexte d'insuffisance médullaire quantitative (41 aplasies médullaires) ou qualitatives (5 MDS). Par ailleurs, notre recherche systématique des clones HPN dans les aplasies médullaires montre que ces clones sont détectables chez 37% des patients, soit plus d'un tiers. Seulement 6 d'entre eux (14,6%) ont présenté des signes biologiques d'hémolyse (LDH et réticulocytes élevés) sans signes d'hémolyse clinique. La taille du clone dans cette catégorie de patients est la plus faible de la série avec une médiane à 22% (intervalle 7 à 41%).

Dans la série de la SFH [21], près d'un quart des patients ayant une HPN ont eu un diagnostic préalable d'aplasie médullaire et une HPN se développe après traitement immunosuppresseur d'une aplasie médullaire dans 20 à 30% des cas. Dans notre série, 29/60 (48%) des patients avec aplasie médullaire traités par des immunosuppresseurs ont un clone HPN. une analyse par CMF n'ayant pas été réalisée au diagnostic et avant tout traitement chez ces patients, nous ne pouvons tirer aucune conclusion quant à l'existence préalable du clone.

- Les formes classiques de 'HPN, hémolytiques et thrombotiques sont retrouvées dans notre série et restent peu fréquentes elles représentent 10,7% (6/56) et 7,1% (4/56) respectivement des HPN diagnostiquées, avec des clones estimés à 75% pour les formes hémolytiques et 80% chez les

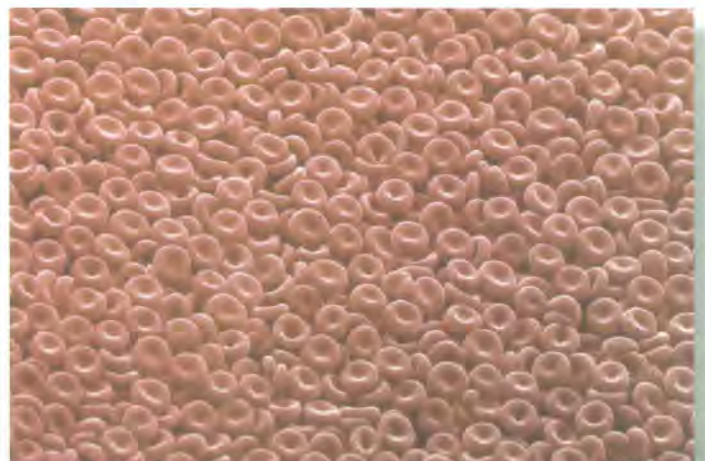
patients ayant des thromboses. Ces taux sont les plus élevés observés dans notre série.

V- CONCLUSION

L'HPN a longtemps été considérée comme une maladie rare ; le développement de la cytométrie en flux, a permis d'en améliorer le diagnostic et les demandes sont de plus en plus fréquentes. Cette technique est actuellement la méthode de référence pour le diagnostic de l'HPN. Elle permet une analyse rapide des populations cellulaires et de rendre des résultats dans un délai maximum de 1h 30 min. Au delà du diagnostic, elle permet aussi le suivi des patients après traitement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]. Dacie JV. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Proc R Soc Med 1963; 56 :587-596.
- [2]. Oni SB, Osunkoya BO, Luzatto L. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria : Evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. Blood 1970; 36 :145-152.
- [3]. Miyata T, Takeda J, Iida Y, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, Maeda K, Kitani T, Kinoshita T. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. Science 1993; 259 :1318-1320.
- [4]. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, Takahashi M, Kitani T, Kinoshita T. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Cell. 1993; 73 :703-711.
- [5]. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Miyata T, Yamada N, Takeda N, Luzatto L, Kinoshita T. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. EMBO J 1994; 13 :110-117.
- [6]. Nafa K, Bessler M, Castro-Malaspina H, Jhanwar S, Luzatto L. The spectrum of somatic mutations in the PIG-A gene in Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria includes large deletions and small duplications. Blood cells Mol Dis 1998; 24 :370-384.
- [7]. Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfield JP, Austen KF. Affected erythrocytes of patients with Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein decay accelerating factor. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80 : 55066-5070.
- [8]. Luzatto L, Bessler M. The dual pathogenesis of Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Curr Opin Hematol 1996; 3 :101-10.
- [9]. Ohashi H, Hotta T, Ishikawa A, Tagushi R, Kigushi T and al. Peripheral blood cells are predominantly chimeric of affected and normal cells in patients with Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: simultaneous investigation on clonality and expression of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins. Blood 1994; 83 :853-9.
- [10]. Socie G, Peffault de Latour, J-Y Mary. Hémoglobinurie paroxystique nocturne. EMC 2010. 13-006-D-25.1-8
- [11]. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzatto L, Dacie JV. Natural history of Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. N Eng J Med 1995; 333 :1253-8.
- [12]. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R. Diagnosis and management of Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Blood 2005;106:3699-709.
- [13]. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry the diagnosis of Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Blood 1996; 87 :5332-5340.
- [14]. Richards SJ, Rawston AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Cytometry 200; 42 : 223-233.
- [15]. Socie G, Annelise Griscelli-Benaceur, Francois Sigaux, Eliane Gluckman. Diagnostic immunocytologique et moléculaire des hémoglobinuries paroxystiques nocturnes. Hematol 1995; 1 :63-65.
- [16]. Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, Barth D, Chang H, Yeo E, Bamford S, Chin-ye Y, Keeney M. Diagnosing PNH with FACS and multiparameter flow cytometry. Cytometry 2007; 72B :167-177.
- [17]. Ham TH, Dingle JH,. Studies on the destruction of red blood cells in chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. J Clin Invest 1939; 18 :657-672.
- [18]. Socie G. Recent advances in Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. From the biology to the clinic. Hematol Cell Ther.1997; 39:175-187.
- [19]. Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Boccuni P, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. Ann Intern Med.1999; 131 :401-408.
- [20]. Luzatto L. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria ; an acquired X-linked genetic disease with somatic cell mutation. Curr Op Genet Dev 2006; 16 :317-32.
- [21]. 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 Hematology. Lancet 1996; 25 :1256-64.



**Le premier Facteur VIII
recombinant en Algérie sans adjonction d'albumine
Formulé avec du Saccharose ⁽¹⁾**



Kogenate® FS

Facteur VIII Recombinant Octocog alfa Formulé avec du Saccharose

***Conçu pour durer...
D'âge en âge, en prophylaxie ou à la demande***

1000 UI



500 UI



250 UI



- ☐ **Pour le traitement des épisodes hémorragiques**
- ☐ **En chirurgie**
- ☐ **En prophylaxie chez l'enfant de 0 à 16 ans**



Bayer HealthCare
Bayer Schering Pharma

(1) Résumé des caractéristiques du produit Kogenate® FS.

en un spectre continu au cours de l'interaction. Ces « transitions directes » diffèrent de celles observées au cours de la diffusion de neutrons par un cristal, car ces dernières sont gouvernées par la structure périodique du réseau cristallin. Les neutrons diffusés par un cristal possèdent une énergie et un moment angulaire bien définies, tandis que les neutrons diffusés par un liquide ont une énergie et un moment angulaire continus. Cependant, malgré cette différence fondamentale, les neutrons diffusés par un liquide possèdent une énergie et un moment angulaire bien définies, car les interactions entre les neutrons et le liquide sont gouvernées par la structure périodique du réseau cristallin. Les neutrons diffusés par un liquide possèdent une énergie et un moment angulaire bien définies, car les interactions entre les neutrons et le liquide sont gouvernées par la structure périodique du réseau cristallin. Les neutrons diffusés par un liquide possèdent une énergie et un moment angulaire bien définies, car les interactions entre les neutrons et le liquide sont gouvernées par la structure périodique du réseau cristallin.

Cause de systèmes d'organes	Effet indésirable	Nombre de patients ayant présenté un effet indésirable (%) (nombre total de patients : 72)	Effet indésirable par perfusion(%) (nombre totale de perfusions : 24 936)
Troubles de la peau et du tissu sous-cutané*	Rash, prurit	6 (8,2)	0,02
Troubles généraux et du point de perfusion	Réactions au point de perfusion	3 (4,1)	0,01

Cause de systèmes d'organes	Effet indésirable	Nombre de patients ayant présenté un effet indésirable (%) (nombre total de patients : 81)	Effet indésirable par perfusion(%) (nombre total de perfusions : 9389)
Troubles du sang et du système lymphatique	Infection du lecteur VIH	9 (15)*	Non discernable
Troubles généraux et du point de perfusion	Réactions au point de perfusion	4 (6,3)	0,04
Troubles de la peau et du tissu sous-cutané	Rash, prurit	10 (16,4)	0,01

* Au cours d'études cliniques menées auprès de patients n'ayant jamais reçu de traitement et d'échantillons d'effets indésirables ont été signalés pendant (9389 perfusions (17,5 %), compris, chez (89) malades pendant (9389 perfusions) et/ou, complication (voir Tableau 3 – Effets indésirables chez les patients n'ayant jamais ou pas souvent reçu de traitement et dont le lien avec AGENTHE 72, les préparations de PAM ou les préparations pour administration parentérale) est établi.

* Pour le développement d'activités, le consommateur est 60 % plus enclin à acheter un produit au détail.

[illegible]

Cause de syndrome d'organe	
Troubles du sang et du système lymphatique	Effet indolérable
Troubles de la peau et du tissu sous-cutané*	Intolérance du FVRI
Troubles gléuxaux et du point de perfusion*	Pneû, ulcères, rash
	Réaction au point de perfusion
	Pyloré
Troubles du système immunitaire	Réaction anaphylactique, autres signes et symptômes d'hyper-sensibilité

Un patient pourra avoir simultanément plus d'une réaction.

[illegible]

Parasitoides		Kopasat FS
Parasitoides status: (a, IT)		Parasitoides in 2ndow semesters (± Exam Type)
AUC (ULHdL)	1598.06 ± 344.52	1437.08±381.73
Cross(ULHdL)	114.96 ± 70.19	106.52±20.09
Derivatives (Hues)	13.74 ± 1.22	14.69 ± 4.36
Recapitulation in two (ULHdL/Hues)	2.20 ± 0.34	2.11±0.37

La pharmacocinétique de Kogate a été étudiée chez des jeunes patients préalablement traités (4,4-10,1 ans ago moyen 12 ans). La comparaison des paramètres pharmacocinétiques des enfants et adultes montre des différences au niveau du Cl_{CR} qui ont été prises en compte dans la formulation de Kogate. Les données de la pharmacocinétique de Kogate chez les enfants sont présentées dans le tableau 10.

Paramètre	valeur
AUC (U/3rdL)	520.0
Clairance (ml/hg)	4.1
Densité (v/v)	10.7 (7.8-15.3)
Fluorescence in vivo	1.9 (1.25-2.16)

[illegible][illegible]

Type d'hémorragie	Taux plasmatique de FVIIa produisant un effet hémostatique	Posologie recommandée pour maintenir le taux plasmatique thérapeutique
Hémorragie légère (hémorragie superficielle ou de durées courtes (hémorragie des gencives, hémorragie des yeux, hémorragie des urines, hémorragie dans le canal biliaire, hémorragies cutanées, transmission conjugué)	20 à 40 %	10 à 20 UI par kg Administrer une autre perfusion si hémorragie persiste.
Hémorragie moyenne ou grave (hémorragie dans un muscle, hémorragie dans le canal biliaire, hémorragies cutanées, transmission conjugué)	30 à 60 %	15 à 30 UI par kg Administrer au moins une autre perfusion 12 à 24 heures plus tard.
Pertes chirurgicales		Dose initiale de 80 à 120 UI par kg Administrer ensuite 20 à 25 UI par kg toutes les 6 à 12 heures.
Fibrines		
Transfusion crétine		Administrer une dose de 50 UI par kg avant l'intervention. Vérifier que le taux de FVIIa est = 100 % avant d'administrer au moins d'autres perfusions, d'abord toutes les 6 à 12 heures et pendant 10 à 14 jours, jusqu'à ce que la cicatrisation soit complétée.
Chirurgies lourdes	- 100 %	

[illegible][illegible]

DIAGNOSTIC DES HEMOGLOBINURIES PAROXYSTIQUES NOCTURNES (HPN) PAR CYTOMETRIE EN FLUX (CMF)

S.Oukid, S.Taoussi, Y. Bouchakor, C.Boucherit, F.Lamraoui, S.Chebrek, C.Guezlane, M.T.Abad

Service Hématologie, EHS ELCC Blida.

RESUME

L'HPN est connue par son polymorphisme clinique et par ses complications qui peuvent être graves.

C'est une affection rare. Cette maladie est associée à une altération importante de la qualité de vie. Elle était par le passé de diagnostic relativement difficile.

Depuis le début des années 1980, les progrès de la cytométrie en flux ont conduit à une réelle avancée dans le diagnostic des clones HPN. Cette technique a été introduite dans le service depuis plus de trois ans ; son application à la recherche du clone HPN a été instaurée depuis environ une année. Nous avons analysé 35 cas où le clone HPN a été recherché par cette technique ; il a été retrouvé chez 12 patients à des degrés variables de déficit.

INTRODUCTION

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ou maladie de Marchiafava-Micheli est une maladie rare, acquise et chronique ; elle est liée à l'expansion clonale d'une ou de plusieurs cellules souches hématopoïétiques, porteuses d'une mutation acquise du gène PIG-A, localisé sur le chromosome X (Xp22) (1). Il en résulte un blocage de la synthèse des molécules d'ancrage de glycophosphatidylinositol (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) (2). 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)

L'HPN à une présentation clinique polymorphe (3) réalisant un tableau soit d'hémolyse soit d'aplasie médullaire. Des études récentes ont montré que 20 à 25% des aplasies médullaires (4) présentent un clone HPN. Nous nous proposons dans cette étude portant sur 35 patients d'évaluer la place de l'HPN en cas d'aplasie médullaire, d'anémie hémolytique à test de Coombs direct (TCD) négatif et de syndrome myélodysplasique.

METHODES D'ETUDE

Il s'agit d'une étude prospective ouverte ayant débuté en Août 2009 dans laquelle nous avons intégré à titre de témoins positifs 4 cas d'HPN connues avant cette date. L'analyse clinique précise les circonstances de découverte. L'étude biologique comprend un hémogramme, un taux de réticulocytes, un TCD, un myélogramme, un taux de LDH, un bilan hépatique, un bilan rénal, un Test de Ham Dacie (fait chez 03 cas) et un test de sucrose (fait chez 1 cas). Un Immunophénotypage sur sang est effectué par cytométrie en flux sur un cytomètre BD FACS Calibur 04 Couleurs, en évaluant le degré du déficit du CD 59 et CD 55 sur les polynucléaires neutrophiles et les globules rouges. Le diagnostic d'un clone HPN est retenu lorsqu'on détecte plus de 5% de cellules déficitaires en CD 55 et surtout en CD 59 sur 02 populations cellulaires différentes.

- Méthodes d'étude et de marquage des cellules

Un prélèvement de sang total frais sur EDTA : 5cc : patient et témoin du jour dans le service, à distance des transfusions sanguines avec acheminement rapide au laboratoire pour étude des globules rouges et des polynucléaires neutrophiles. Numération sanguine (malade et témoin). Préparation de 02 échantillons selon les figures suivantes (Figures 1 et 2)

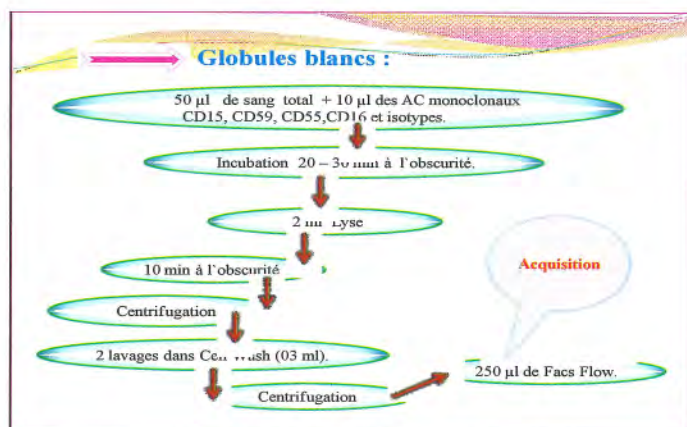


Figure 1 : Préparation pour les globules blancs avec gating sur les polynucléaires neutrophiles.

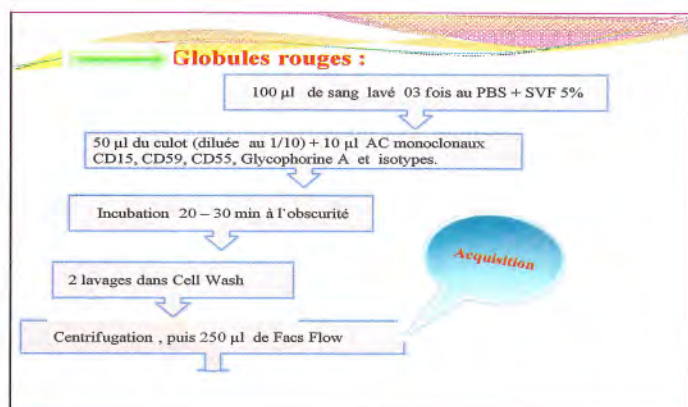


Figure 2 : Préparation pour les globules rouges

- Méthodes d'analyse

L'analyse par CMF des cellules du patient se fait systématiquement en parallèle avec les cellules du témoin. L'analyse est faite sur les Dot plots et les histogrammes. Détermination des différentes populations sur FSC/SSC. Gating sur la population à étudier puis deuxième Gating sur le marquage spécifique de la lignée : exemple : premier Gating sur les globules rouges puis deuxième Gating sur la Glycophorine A pour analyse.

Analyse des Histogrammes de fluorescence avec superposition des graphes du malade avec le témoin (overlay) (zone négative, positive et projection des données du patient).

La CMF permet une identification d'une population déficiente (GPI), une estimation de la proportion de cellules déficitaires (taille du clone) exprimée en % et précise le type du déficit : total (type III) ou partiel (type II) (7) (Figure 3)

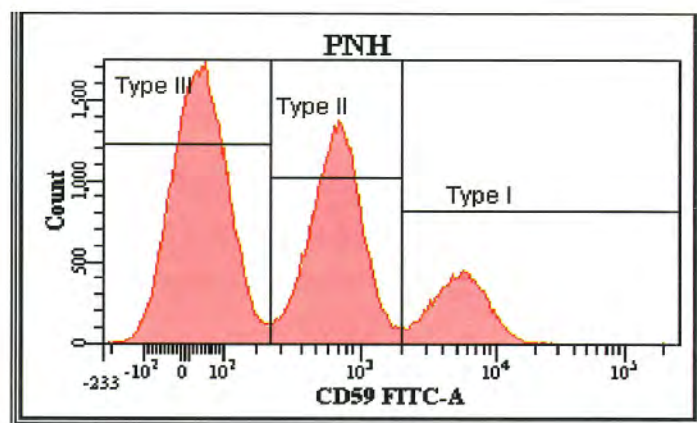


Figure 3 : Les différents types de déficits (7)

RESULTATS

Le clone HPN a été recherché par CMF chez 35 patients : Il s'agit de 17 femmes et 18 hommes, avec une moyenne d'âge de 33 ans (16 - 62).

- Circonstances de découverte :

- Aplasie médullaire : 13 cas
- Anémie hémolytique : 09 cas (TCD négatif : 06 cas, non fait : 03 cas).
- Aplasie médullaire et hémolyse : 08 cas.
- Aplasie médullaire sur grossesse : 03 cas
- Myélodysplasie : 01 cas
- Anémie de Fanconi : 01 cas

- Résultats de la CMF

* Absence de déficit : 23 cas (66%).

* Présence d'un déficit portant sur les deux protéines CD 55 et CD 59 simultanément sur les polynucléaires neutrophiles et les érythrocytes dans 12 cas (34%).

Présentation clinique des HPN (tableau I)

Il s'agit de 04 femmes et 08 hommes, avec une moyenne d'âge de 33 ans (17 - 49).

Circonstances de découverte du clone HPN :

- Aplasie médullaire : 05 / 13 cas (38%).
- Anémie hémolytique à TCD négatif : 02 / 09 cas (22%).

- Aplasie médullaire et hémolyse : 03 / 08 cas (37,5%).
- Aplasie médullaire sur grossesse : 01 / 03 cas (33%).
- Myélodysplasie : 01 cas

Présentation biologique des HPN :

Hémogramme :
 - Pancytopénie : 10 cas
 - Bicytopenie : 01 cas
 - Anémie hémolytique à TCD négatif : 01 cas.

Test d'Ham Dacie : réalisé dans 03 cas : positifs.
 Test au Sucre : réalisé dans 01 cas : positif.

Patients	Age	Sexe	Diagnostic	Test Ham Dacie	CD59 PN%	CD55 PN%	CD59 GR%	CD55 GR%	TYPE
1	29	F	Aplasie médullaire sur grossesse	Non fait	22	67	27	38	III
2	31	F	Anémie hémolytique TCD négatif	Non fait	49	49	9	8	III
3	42	F	Aplasie médullaire	Non fait	63	69	24	24	III
4	42	F	Aplasie médullaire + hémolyse	Non fait	44	85	08	16	II
5	17	M	Aplasie médullaire + hémolyse	+ 5% de lyse	15	96	65	82	III
6	30	M	Myélodysplasie	78% de lyse	10	96	59	68	MIXTE
7	30	M	Anémie hémolytique TCD négatif	SUCROSE +	7	9	7	15	III
8	30	M	Aplasie médullaire	POSITIF	53	84	15	27	MIXTE
9	39	M	Aplasie médullaire	Non fait	17	94	49	56	II
10	49	M	Aplasie médullaire	Non fait	12	14	12	14	II
11	19	M	Aplasie médullaire + hémolyse	Non fait	13	29	43	67	MIXTE
12	48	M	Aplasie médullaire	Non fait	34	12	57	41	III

Tableau I : Les résultats cliniques et biologiques des 12 patients HPN

Type de déficit en molécules GPI déterminé par CMF : (tableau I)

Patients présentant un déficit partiel : 03 cas
 Patients présentant un déficit total : 06 cas
 Patients présentant un déficit mixte : 03 cas

Illustration par un cas :

Patient de sexe masculin âgé de 30 ans qui consulte pour une Anémie d'évolution chronique avec une pancytopenie. L'exploration hématologique a conclu à une myélodysplasie (MDS). Devant l'âge et les signes d'hémolyse un Test d'Ham Dacie revient positif : 78 % de lyse. La cytométrie en flux objective un déficit de CD 59 et CD 55 sur les globules rouges et PNN confirmant ainsi le diagnostic HPN (figures 4 et 5).

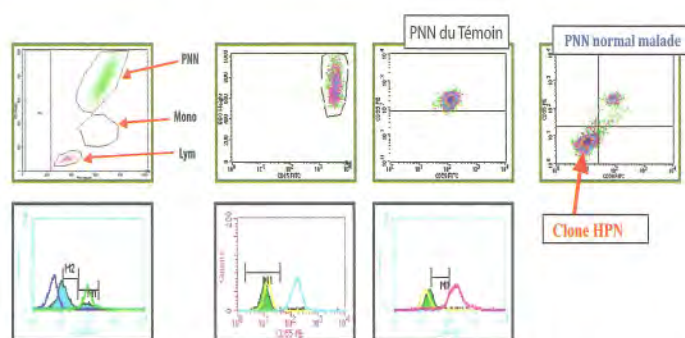


Figure 4 : Expression de CD 59 et CD 55 sur les PNN

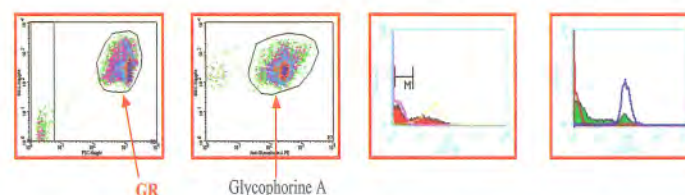


Figure 5 : Expression de CD 59 et CD 55 sur les globules rouges

COMMENTAIRES

Une étude marocaine d'application de la CMF au diagnostic de l'HPN (5) a retrouvé sur 10 patients typés 04 cas d'HPN (40%) chez 03 hommes et une femme avec une moyenne d'âge de 32 ans (25-51).

Trente % des patients atteints d'HPN se présentent avec un tableau de pancytopenie chronique (6), pouvant progresser vers une aplasie médullaire (7) ; 30 à 40 % des patients atteints d'aplasie médullaire traités par immunosuppresseurs développent une HPN, habituellement d'expression uniquement biologique. Les études récentes ont montré que 20 à 25% des aplasies médullaires présentent un clone HPN. Dans notre étude, dans les aplasies médullaires le pourcentage des HPN diagnostiquées est de 38%.

Les tests classiques pour diagnostiquer une HPN manquent de sensibilité et de spécificité. La CMF est la technique qui est plus sensible et plus spécifique que les tests traditionnels.

L'analyse des polynucléaires neutrophiles surtout le CD 59 permet une bonne estimation de la taille du clone HPN. Devant un petit clone d'HPN il faut répéter l'exploration par CMF pour voir l'évolution de la taille de clone dans le temps. Devant le tableau d'hémolyse quelque soit l'étiologie associée, quand le premier examen par CMF est négatif cela n'élimine pas le diagnostic d'HPN ; mais cela nous pousse à refaire l'examen au moins tous les 6 mois à la recherche d'un petit clone HPN.

CONCLUSION

Dans notre étude, la CMF a été déterminante pour le diagnostic d'HPN. Elle devrait être pratiquée systématiquement devant toute aplasie médullaire à la recherche d'un clone HPN et aussi devant toute anémie hémolytique acquise à TCD négatif et dont l'étiologie n'est pas évidente ainsi qu'au cours des syndromes myélodysplasiques et en cas de thrombose inhabituelle récidivante. Il faudra également répéter la recherche de clone HPN après une première analyse négative en particulier en cas de tableau d'aplasie médullaire et d'hémolyse associée, et aussi en cas d'un petit clone pour suivre son évolution dans le temps.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 – Régis Peffault de Latour, Gérard Socié
L'hémoglobinurie paroxystique nocturne
Service d'hématologie-greffe, hôpital Saint-Louis, 75475
Paris Cedex 10
- 2- Hilmen P, Richards S. Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria
Br J Haematol 2000, 109 : 470-479
- 3- G. Socié, C. Ferry, M. Robin, J.-Y. Mary
Aplasies médullaires acquises
EMC 2009
- 4 - Peffault de Latour R et al. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) : long-term epidemiological study.
Blood 2006; 108 :Abstract 972
- 5- F. BACHIR
Application de la CMF au diagnostic de l'HPN
27/11/2008
Institut National d'Hygiène Rabat Hémoglobinurie paroxystique nocturne
- 6 - Z. Amoura Service de Médecine Interne Centre de Référence « Maladies Auto- Immunes Rares »
CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, Franc
- 7 - Moyo V.M et al. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays.
B J Haematol 2004; 126 : 133-8



Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique Ministère de la Santé et de la Population et de la Réforme hospitalière

La Société Algérienne d'Hématologie et de Transfusion Sanguine

VIII^{ème} Congrès National d'Hématologie
XXVI^{ème} Journée Nationale

Du 27 au 29 mai 2011
SHERATON Oran

Thèmes:

- Leucémies aiguës
- Coagulopathies congénitales (hors hémophilie)

Informations: mabekensat@yahoo.fr; mabekad@yahoo.fr
www.hematologie-dz.com

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

S.Hamdi, H.Hamouda, A.Achichi, Z.Bouhadda

Service Hématologie, CHU Sétif

RESUME

Cette étude concerne 12 patients ayant bénéficié d'une recherche du clone HPN en cytométrie en flux durant l'année 2009. Les manifestations cliniques sont polymorphes. 6 patients sont déjà suivis pour une anémie hémolytique de novo avec ou sans thrombose. Quatre malades présentent une aplasie médullaire nouvellement diagnostiquée et deux, une myélodysplasie. Le bilan d'orientation est basé sur l'examen clinique, biologique et pour certains le test de Ham-Dacie. La cytométrie en flux a mis en évidence 4 cas de clone HPN soit une fréquence de 33%. L'identification du clone est caractérisée par sa taille, c'est-à-dire, le degré de sévérité, celui-ci oscille dans cette étude entre 22-88% et, le type de déficit du clone représenté par la prépondérance du type III (3 cas). L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti CD55, CD59, CD14, CD16 et GlycophorineA, marqueurs des globules rouges et des globules blancs ont permis l'analyse et le diagnostic en CMF.

Mots clés : Hémoglobinurie paroxystique nocturne, hémolyse intravasculaire, thrombose, aplasie médullaire, myélodysplasie, et cytométrie en flux.

INTRODUCTION

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ou maladie de Marchiafava Michelli est une maladie hémolytique acquise liée à une anomalie clonale d'une ou de plusieurs cellules souches hématopoïétiques porteuses d'une mutation somatique du gène PIG-A(Phosphatidyl Inositol Glycane), localisé sur le chromosome X (Xp22). Cette mutation empêche ou limite la synthèse normale du système d'ancrage glycosyl phosphatidylinositol (GPI) à de nombreuses protéines membranaires tels que les decay accelerating factor (DAF) ou CD55 et membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL) ou CD59, dont le rôle est d'inhiber l'action lytique du complément. Il en résulte un déficit partiel ou total en CD55 et CD59 à la surface des cellules sanguines (globules blancs, plaquettes et globules rouges). Ces derniers sont à l'origine de

l'hémolyse intravasculaire caractéristique de la maladie [1,2, 3, 4,5]. Les progrès de la cytométrie en flux et de la biologie moléculaire ont contribué à une avancée majeure dans la connaissance de la physiopathologie de cette maladie rare dont la fréquence est de 7-15 cas / millions d'habitants [1,2]. Les manifestations de cette maladie sont polymorphes. Certes, la plus classique est celle d'une anémie hémolytique acquise à test de Coombs négatif, mais des complications thrombotiques, d'aplasie médullaire voire de myélodysplasie sont retrouvées dans 20-30% des cas.

Nous nous proposons de rechercher un clone HPN et d'en évaluer le type et le degré chez un groupe de patients présentant une anémie hémolytique de novo avec ou sans thrombose, une aplasie médullaire ou une myélodysplasie.

MATERIEL ET METHODES

Cette étude rétrospective réalisée en 2009, porte sur 12 patients chez lesquels, un clone HPN est suspecté. Le diagnostic est recherché devant les manifestations cliniques qui sont à type de pâleur cutanéomuqueuse associée ou non à un ictère. Nous pratiquons un hémogramme avec un taux de réticulocytes à la recherche d'une anémie régénérative. Un myélogramme et/ou une ponction biopsie osseuse avec étude anatomopathologique devant respectivement des signes d'insuffisance médullaire ou de myélodysplasie. Le bilan d'hémolyse comprend le dosage de la bilirubine totale et indirecte, le test de Coombs direct (TCD), le taux de LDH et d'haptoglobine. Le bilan d'orientation est basé sur le test de Ham-Dacie, celui-ci évalue le taux de lyse des hématies à l'action lytique du complément en milieu acide. La cytométrie en flux est la méthode de référence pour le diagnostic de l'HPN :

- Principe :

Elle est pratiquée sur sang périphérique. L'immunophénotypage des cellules est fait grâce un cytomètre à flux Epics XL 4C (Beckman Coulter) avec un laser Argon (excitation à

488nm). Le double marquage est réalisé par les opticlones (Beckman Coulter) contenant en même temps deux anticorps directement marqués, l'un à la fluorescéine (FITC), l'autre à la phycoérythrine (PE). Nous utilisons des anticorps spécifiques des antigènes normalement ancrés par le GPI à la surface des globules rouges, des polynucléaires neutrophiles et des monocytes. Ces anticorps (Ac) sont des Ac anti-CD55 et Ac anti CD59 des populations érythrocytaires, monocytaires (détection par Ac anti-CD14) et de polynucléaires neutrophiles (détection par les Ac anti CD16). Le diagnostic est basé sur le déficit de deux molécules membranaires sur au moins deux lignées.

Le diagnostic de certitude est porté devant la détection de plus de 5% de cellules déficitaires en CD55 et CD59 [2, 3, 4, 5, 6, 7].

- Technique d'étude :

Pour l'étude des érythrocytes, 5ml de sang sont prélevés dans un tube contenant de l'EDTA et dilué au 1/100 par du PBS. Le fenêtrage est fait par la glycophorine A en PE qui sera diluée au 1/30. Chaque tube (3tubes) contient 100µl de sang dilué ainsi que 10µl de glycophorine A diluée auxquels on rajoute 10µl d'Ac-antiCD55 dans le 2ème tube et 10µl d'Ac anti-CD59 dans le 3ème tube. Une incubation de 15 minutes a lieu dans l'obscurité. Un lavage avec centrifugation est réalisé, suivi d'une acquisition au CMF.

Pour l'étude des globules blancs, 100 µl de sang sont mélangés à 20µl d'Ac (CD16, CD55, CD59 et CD14). Après une incubation de 15-20 minutes à l'obscurité, les cellules sont lysées par 1ml de versalyse, une deuxième incubation est faite suivie d'un double lavage par 2ml du PBS et l'acquisition est faite au CMF.

RESULTATS

1/ Données épidémiologiques

Les 12 patients de l'étude sont âgés de 15 à 65 ans avec une moyenne d'âge à 38 ans. La population est composée de 7 hommes et 5 femmes avec un sex.ratio de 1,4.

2/ Caractéristiques cliniques

Tous les patients ont une pâleur cutanéomuqueuse, le subictère est présent chez 6 patients, accompagné d'hémoglobinurie dans 3 cas et de thrombose dans 2cas. Un syndrome hémorragique est retrouvé chez 5 patients dont 4 avec un tableau

d'aplasie médullaire (AM) et un rattaché à une myélodysplasie (MDS).

3/ Caractéristiques biologiques

L'anémie est sévère et de type macrocytaire régénérative dans les 6 cas d'hémolyse. La leuco neutropénie modérée n'est retrouvée que chez un 1/3 des patients. La perturbation des tests d'hémolyse est retrouvée dans les cas d'anémie hémolytique. La négativité du test de Coombs est classique. Le test de Ham-Dacie fait chez 8 patients est positif dans 5 cas dont 4 dans un tableau d'hémolyse. Les résultats de moelle osseuse sont en rapport avec le diagnostic initial d'aplasie médullaire ou de myélodysplasie (Tableau I).

Paramètres	Résultats
Taux d'hémoglobine moyen (g/dl)	5,85 (3,8 - 8,6)
Volume globulaire moyen (µ³)	101,34 (83 -116)
Taux de réticulocyte s moyen (/mm³)	141358 (10400 - 287000)
Leuco neutropénie	Modérée: 4 cas
Thrombopénie	- Sévère : 5 cas - Modérée: 3 cas
Taux moyen de Bilirubine libre	18 mg/l
Test de Coombs direct	Négatif : 100%
Taux moyen des LDH (n: 6)	800 UI/l (770-2745)
Test de Ham et Dacie (n: 8)	Positif : 5 cas
Médullogramme (n: 6)	- Pauvre (AM) : 4 cas - Riche (MDS) : 2 cas

Tableau I : Caractéristiques biologiques des patients

4/ Recherche du clone HPN

- L'immunophénotypage par cytométrie en flux réalisé chez les 12 patients a mis en évidence un déficit portant sur les deux protéines CD55 et CD59 pour les globules rouges et les polynucléaires neutrophiles et, sur le CD14 pour les monocytes, chez 4 patients concluant à une fréquence de 33% du clone HPN.

- L'analyse du tableau II rapporte une similitude des résultats entre le test de Ham-Dacie (lorsqu'il est fait) et la CMF en dehors d'un cas de positivité supplémentaire du test de Ham-Dacie.

- Le clone HPN est retrouvé dans 50% des cas d'anémie hémolytique, dans 25% des cas d'aplasie médullaire et dans aucun cas de myélodysplasie.

	Ham-Dacie +	Ham-Dacie -	CMF +	CMF N
Anémie hémolytique (n:4)	3	1	2	2
AH + Thrombose (n:2)	1	1	1	1
Aplasie médullaire (n:4)	1	NF	1	3
Myélodysplasie (n:2)	NF	1	0	2
Clone HPN			4 (33%)	8

Tableau II : Recherche du clone HPN dans différentes affections

(N : normal, NF : non fait, +: positif, -: négatif)

- Le tableau III met en évidence les caractéristiques des patients ayant un clone HPN. La moyenne d'âge est de 30 ans (15-65).

Patients	1	2	3	4
Age	17	23	15	65
Diagnostic initial	AH +Thrombose	AH	AM	AH
Subictère	+	+	-	+
SPM	-	+	-	-
Hémoglobinurie	+	+	-	+
Hémoglobine (g/dl)	5,5	4,3	6	3,8
Réticulocytes /mm ³	142000	287000	10400	250000
Plaquettes /mm ³	285000	58400	24000	125000
TCD	-	-	-	-
Ham et Dacie (%)	+	+	+	+

Tableau III : Caractéristiques des patients ayant un clone HPN

5/ Analyse de la taille et du type de déficit du clone HPN

L'identification de la population déficiente en molécules GPI- dépendante est en rapport d'une part, avec l'estimation du taux des cellules GPI déficients (taille du clone) et d'autre part avec le type de déficit. Lorsque le déficit est total, le clone HPN est de type III et lorsque le déficit est partiel, le clone est de type II. Dans ce travail, le taux de cellules GPI déficients de la population étudiée varie de 22% à 88% (figure 1) et le type III est retrouvé dans 75% des cas (figure 2).

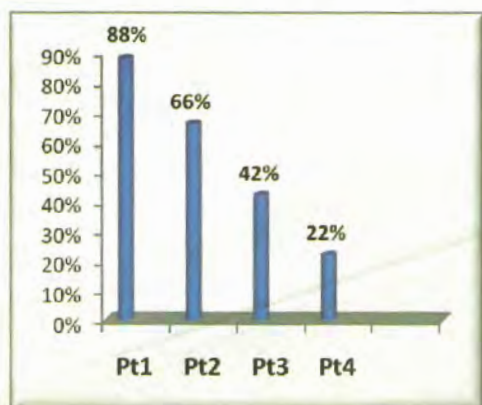


Figure 1 : Evaluation de la taille du clone

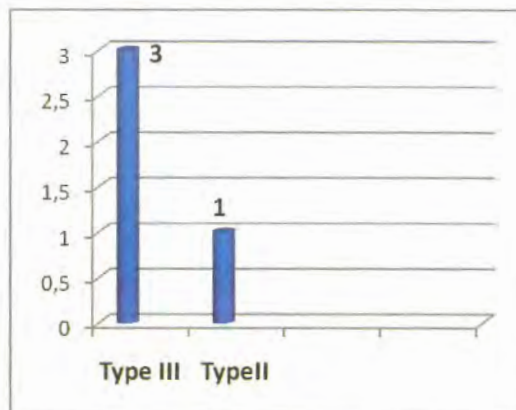


Figure 2 : Type de clone

6/ Iconographie de cas étudiés en CMF

- La figure 3 illustre l'image en cytométrie en flux d'un patient âgé de 65ans qui présente une pâleur cutanéomuqueuse, un subictère, une hémoglobinurie, un taux d'hémoglobine à 3,8 gr/dl, un VGM à 116μ³, un taux de réticulocytes à 160000/mm³. Un test Coombs négatif et un taux de LDH à 806 UI.

L'analyse en biparamétrique reflète l'image d'un clone HPN évident.

L'analyse en monoparamétrique montre une faible expression du clone HPN sur les GR, alors que l'expression du clone est plus nette sur les PN et les monocytes. D'autre part, le taux moyen de la population déficiente est de 22% et le type II est majoritaire par rapport à la population de type III.

- La figure 4 exprime les résultats en CMF d'un patient âgé de 27ans, qui présente une anémie hémolytique régénérative à test de Coombs négative et un taux de LDH à 2745 UI.

On distingue un clone HPN important de type III par les marqueurs (CD55-59) sur les globules rouges et sur les globules blancs. Le taux moyen de la population déficiente est de 66%.

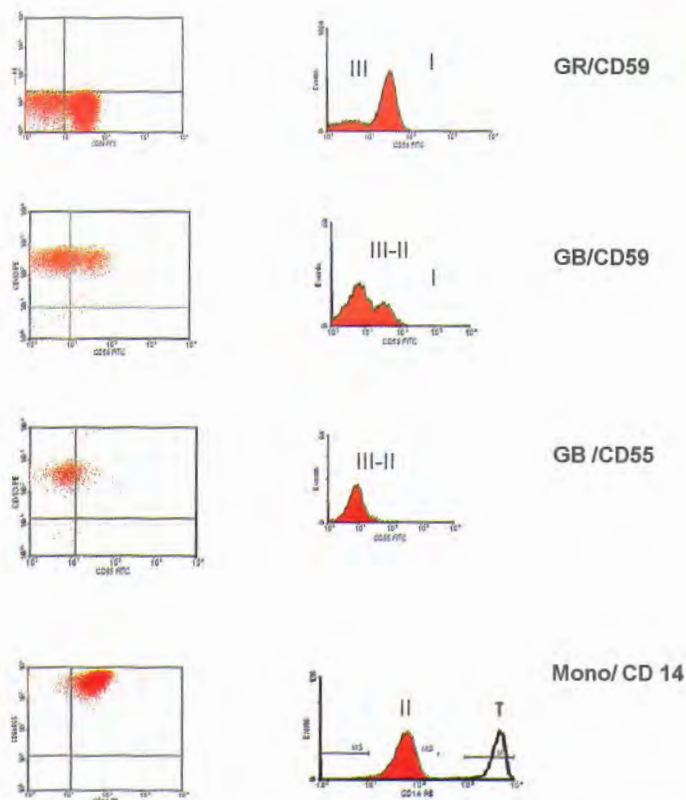


Figure 3 : CMF mettant en évidence un Clone HPN type II prédominant

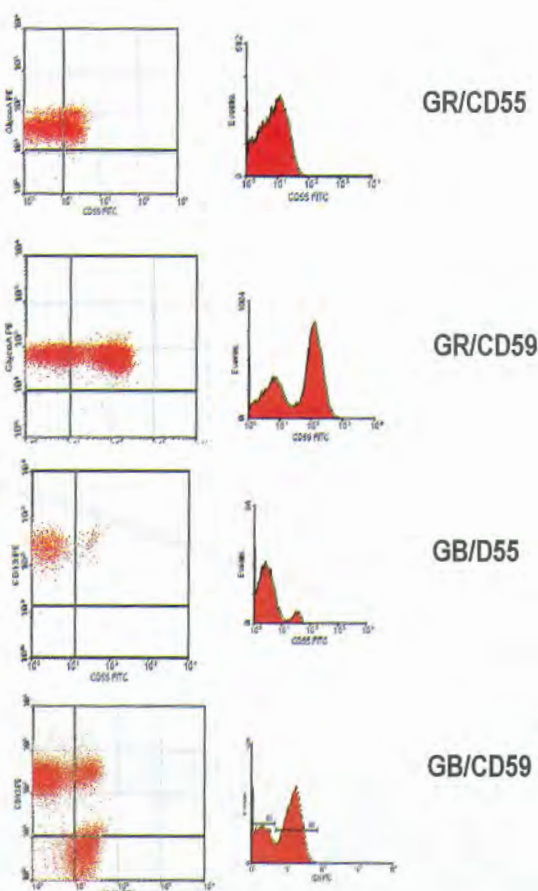


Figure 4 : CMF objectivant un Clone HPN type III

DISCUSSION

- La moyenne d'âge à 30ans est dans l'intervalle des données publiées [1, 2, 8, 9].

- Les circonstances de découverte de l'HPN sont polymorphes: la plus classique étant l'anémie hémolytique de novo à test de Coombs négatif, les 3 cas de clone HPN retrouvés dans cette étude se réfèrent aux anémies hémolytiques. Cependant des clones HPN au cours des aplasies médullaires, des myélodysplasies ou des thromboses inexpliquées sont largement retrouvés dans les grandes séries par rapport à la notre, qui est restreinte [1, 2, 8].

- Le clone HPN retrouvé à 50% dans l'anémie hémolytique avec ou sans thromboses est dans l'intervalle des séries publiées [1, 2,6]. Le taux de découverte de ce clone au cours des aplasies médullaires à 25% se rapproche de celui décrit dans la littérature (30%). Dans les cas de myélodysplasies, l'absence du clone HPN est probablement en rapport avec la série limitée et qu'une étude immunophénotypique par CMF sur une large série serait plus significative [2, 6, ,8 9].

- L'incidence du clone HPN dans cette étude à 33% rejoint les résultats des différents travaux publiés pour lesquels une moyenne de 32,7% est rapportée [8,9,11].

- Le faible clone HPN évalué sur les GR d'un patient s'explique par l'effet transfusionnel sur cette lignée et comme cela est décrit dans la littérature les molécules ancrées par le GPI sur les leucocytes étant indépendantes des transfusions sanguines, le déficit en protéines CD 55 et CD 59 est bien marqué sur les leucocytes confirmant la sensibilité de la CMF dans le diagnostic de l'HPN [1,2, 6].

- D'autre part, si le diagnostic des formes de novo et les résultats des tests classiques sont en général concordants avec ceux de la cytométrie en flux, le diagnostic des HPN survenant après aplasie médullaire peut être caractérisé par un déficit des molécules GPI sur la lignée granulocytaire et/ou monocyttaire et peut épargner les globules rouges ; cela expliquerait la négativité des tests classiques de Ham-Dacie et sucrose [1, 2, 5,6].

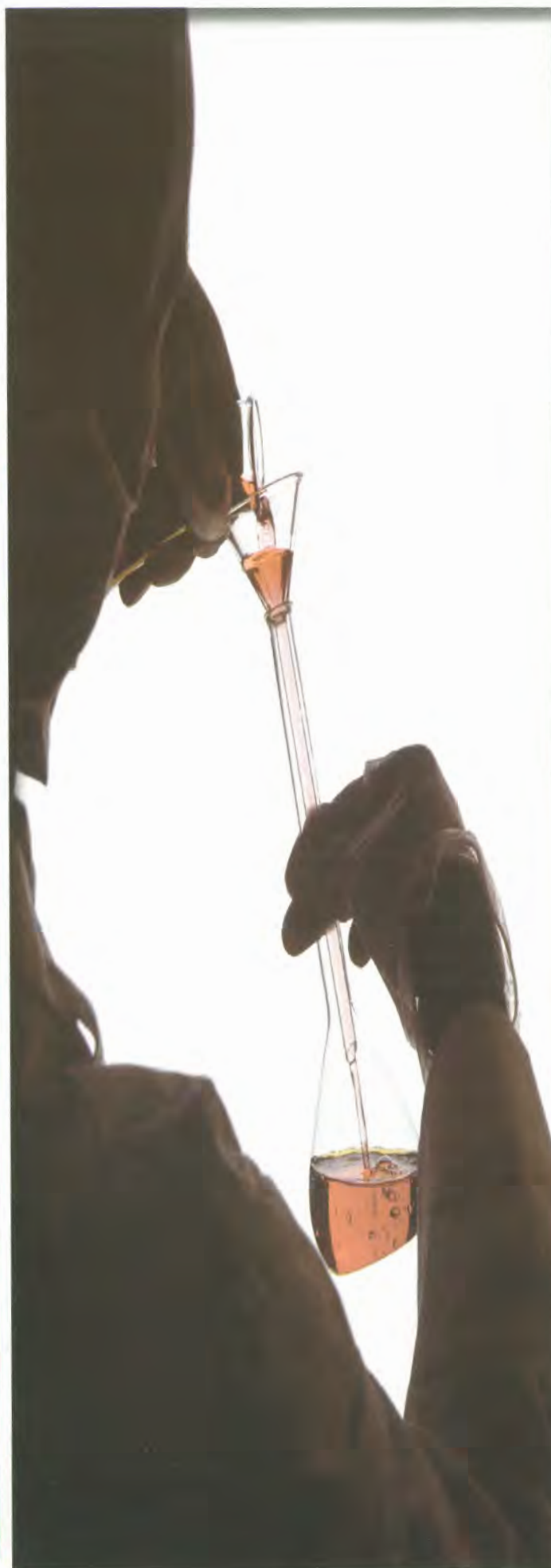
- Les taux en rapport avec la taille et le type du clone HPN sont variables d'une étude à l'autre [8, 9,10].

CONCLUSION

La cytométrie en flux est devenue le bilan diagnostique de référence du clone HPN grâce à sa sensibilité et à sa spécificité. Elle permet de détecter un déficit des molécules GPI avec des clones HPN très faible. Elle a supplantée les tests de Ham-Dacie et de sucrose. Elle doit être pratiquée systématiquement devant toute anémie hémolytique acquise à TCD négatif dont l'étiologie n'est pas évidente, comme les thromboses inhabituelles récidivantes, les aplasies médullaires et les syndromes myélodysplasiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1/ Socié.G, Gluckman.E. Hémoglobinurie paroxystique nocturne. EMC.Hématologie [13-006-D-25] (1997).
- 2/ Parker C, Omine M, Richards S. et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 2005; 106: 3699-3709.
- 3/ Hernandez-Campo PM, Almeida J, SanchezM et al. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositolanchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Cytometry B Clin Cytom 2006;70:71-81.
- 4/ Merle-Béral H, Le Garff-Tavernier M. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux. EMC. Hématologie, 13-000-L-10, 2008.
- 5/ Richards SJ, Hill A, Hillmen P. Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Cytometry B Clin Cytom 2007;72: 291-8.
- 6/ Peffault de Latour R, Mary JY, Salanoubat C et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. Blood 2008;112: 3099-3106.
- 7/ Belakehal S. et al. Harmonisation du protocole de diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne en Algérie. Hématologie. Vol 17, suppl.1 mars 2011.
- 8/ Harieche.F, Zerhouni, F, Hamladi. RM.Hémoglobinurie paroxystique nocturne : mise en évidence d'un clone HPN par cytométrie en flux. VIIème Congrès National de la SAHTS.8-10 mai 2010.
- 9/ Oukid.,S, Taoussi.S, .Abad. MT.Aspect clinique et diagnostic des Hémoglobinuries paroxystiques nocturnes. VIIème Congrès National de la SAHTS.8-10 mai 2010.
- 10/ Saidi.S , Brahimi.M, Bekadja. MA,Touhami. H. Diagnostic de l'HPN par cytométrie en flux à Oran. VIIème Congrès National de la SAHTS.8-10 mai 2010.
- 11/ Hamouda.H, Hamdi.S. Apport de la cytométrie en flux dans le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne. VIIème Congrès National de la SAHTS.8-10 mai 2010.



changing possibilities in haemophilia®

Notre objectif est d'améliorer la qualité
de vie des patients hémophiles

Nous œuvrons pour que ces patients aient la liberté de bâtir leur vie selon leurs ambitions
et leurs désirs personnels, sans subir les contraintes imposées par leur maladie

Novo Nordisk privilégie **le patient** dans tout ce qu'il fait et s'engage avec passion
auprès des hémophiles. Nous nous efforçons d'élever le niveau des soins
et de permettre à tous de bénéficier d'une bonne **qualité de vie**

Ulla Hedner

Initiatrice des recherches sur le **rFVIIa**



HARMONISATION DU PROTOCOLE DE DIAGNOSTIC DE L'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE

S. SE Belakehal¹, D Saidi², MC Brahimi³, S Oukid⁴, H Hammouda⁵, F Harieche⁶, A Oularbi⁷, M Malika⁷, S Benichou⁸, S Mehla⁹, O Djidjik⁹, FZ Ardjoun¹, H Touhami², A Bekadja³, MT Abad⁴, S Hamdi⁵, RM Hamladji⁶, H Ait Ali⁷, Z Zouaoui⁸, M Belhani⁹

1 Service d'hématologie HCA; 2 Service d'hématologie CHU Oran; 3 Service d'hématologie EHU Oran; 4 Service d'hématologie CAC Blida ; 5 Service d'hématologie CHU Sétif, 6 Service d'hématologie, CPMC, Alger, 7 Service d'hématologie, CHU Tizi-Ouzou, 8 Service d'hématologie, CHU Sidi-Bellabes, 9 Service d'immunologie et d'hématologie, CHU Benimessous

RÉSUMÉ :

Introduction : L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) 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 de glycoprophosphatidylinositol (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). L'HPN est la conséquence d'un déficit d'ancrage membranaire de ces deux protéines, se manifestant sur le plan clinique par une hémolyse intravasculaire. La cytométrie en flux est la méthode de choix pour l'identification des déficits cellulaires en molécules GPI.

Méthodes : Lors du 4ème workshop sur l'HPN, organisé en juin 2010, le Groupe Algérien de Cytométrie en flux a mis en point un consensus sur les indications et la description de la procédure de détection d'un clone HPN par cytométrie en flux. Une deuxième relecture du protocole a été nécessaire, pour la validation définitive du protocole.

Résultats : Nous avons discuté pendant ce workshop les critères d'inclusion pour un immunophénotypage par cytométrie en flux, la fiche de demande d'immunophénotypage pour une HPN, le protocole d'acquisition, la stratégie de gating, et le compte rendu de la CMF.

Conclusion : Ce document est une référence pour les laboratoires d'analyse par cytométrie en flux dans le diagnostic d'une HPN.

Mots clés : cytométrie en flux, hémoglobinurie paroxystique nocturne, harmonisation du protocole.

1-INTRODUCTION

Gull puis Strübing décrivent à la fin du XIX siècle les observations de patients présentant une asthénie, une hémoglobinurie intermittente accompagnée d'hémolyse intravasculaire [1]. Marchiafava et Nazani en 1911, puis Micheli en 1931, établissent le tableau clinique classique de la maladie qui porte leur nom (maladie de Marchiafava-Micheli). Enneking introduit à la même période le terme d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) [2]. L'HPN est aujourd'hui considérée comme une maladie de la cellule souche hématopoïétique, de nature clonale.

Depuis le début des années 1980, les progrès de la cytométrie en flux ont conduit à une réelle avancée dans la connaissance de la physiopathologie de cette maladie rare (460 cas diagnostiqués en 50 ans ; données de la Société française d'hématologie [SFH] [3]).

2-CRITERES D'INCLUSION POUR UN IMMUNOPHENOTYPAGE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

- Toutes les aplasies médullaires acquises,
- Anémie réfractaire avec bilan d'hémolyse perturbé (LDH, RETICULOCYTE),
- Hémoglobinurie,
- Anémie hémolytique auto-immune à TCD négatif,
- Thromboses artérielles et veineuses avec sites atypiques : thrombose cérébrale, Budd-Chiari, après avoir éliminé un syndrome

myéloprolifératif, et une thrombophilie,

- Cytopénie inexplicquée, avec une moelle riche et des signes de dysplasie,
- Episodes de dysphagie et / ou de douleurs abdominales avec un bilan d'hémolyse perturbé (LDH, RETICULOCYTE).

3-FICHE DE DEMANDE D'UN IMMUNOPHENOTYPAGE POUR HPN

Cette fiche doit être accompagnée d'un hémogramme systématique, et doit comporter le nom, le prénom, la date et lieu de naissance, la profession, et les antécédents personnels :

- Toxiques : OUI / NON
- Transfusion :
– OUI / NON
- Fréquence :
- Date de la dernière transfusion :
- Thrombose : OUI / NON
- Traitement immunosuppresseur : OUI / NON, si OUI, préciser :

4-PROTOCOLE D'ANALYSE

a- PRELEVEMENT ET ACHEMINEMENT :

- Sang veineux, dans un tube à EDTA, et exceptionnellement dans un tube hépariné,
- Quantité de sang : 3 ml,
- Le prélèvement doit être fait de préférence au niveau du centre d'immunophénotypage. Exception faite pour les patients avec une altération de l'état général. 2 tubes doivent être envoyés dans moins de 48H, l'un conservé à +0°C et l'autre à température ambiante.

b- LES COMBINAISONS D'ANTICORPS ET DE FLUOROCHROMES :

- pour les hématies :

- CD59 – PE (clone MEM 43),
- Glycophorine A (CD235a) – FITC pour le gating,
- L'analyse seule des hématies n'est pas recommandée

- pour les polynucléaires neutrophiles :

- CD59 et le CD55 ne sont pas recommandés
- CD66b-FITC
- CD24-PE
- CD33 ou CD15 troisième couleur, pour le gating, et de préférence le CD15.

- pour les monocytes :

- CD14 – PE
- CD64 – FITC
- CD33 - Troisième couleur,
- pour les lymphocytes :
- L'analyse des lymphocytes en routine n'est pas recommandée

- Pour les cytomètres 4 couleurs : on rajoute le CD45 – Quatrième couleur

- Les contrôles négatifs ne sont pas nécessaires.

- FLEAR sous forme liquide (Ptox Biotech, Victoria BC, Canada) : doit être utilisé dans un avenir très proche en Algérie, pour l'analyse des globules blancs.

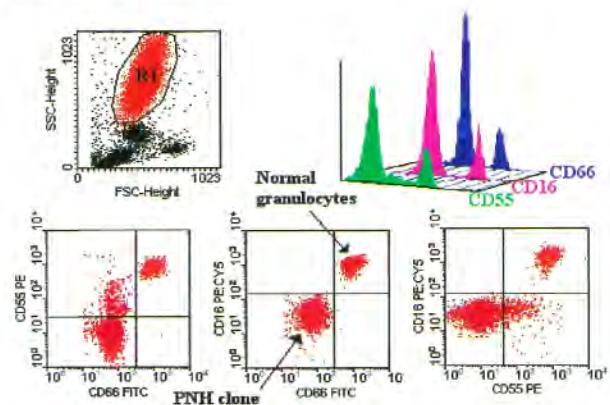


Figure 1 : clone HPN ; symposium HPN, 31 janvier 2008, R. PEFFAULT de LATOUR

c - LA LYSE

- quand on utilise 3 couleurs : on fait une lyse wash,
- quand on utilise 4 couleurs : on fait une lyse no wash,
- on utilise la FACS lyse diluée pour les cytomètres BD,
- on utilise la Versalyse non diluée pour les cytomètres BC,
- quantité : 2 ml (diluée au 1/10^e),
- on n'utilise pas de lyse pour les hématies.

d - LA PREPARATION DES GLOBULES BLANCS

1. prendre 100 µl de sang total,
2. on ne lave pas avec du PBS,
3. centrifugation à 1000 T/min, pendant 5 min
4. on rajoute 10 µl d'anticorps dans chaque tube (voir les recommandations du fournisseur),

5. incubation 15 à 20 min à l'obscurité,
6. ajouter 2 ml de lyse diluée (FACSLYSE) au 1/10ème,
7. laisser 10 minutes à l'abri de la lumière, à température ambiante,
8. centrifugation à 1000 T/min, pendant 5 min,
9. on lave 2 fois avec du PBS (3ml),
10. reprendre le culot dans 250 µl à 500 µl cell wash,

e- LA PREPARATION DES HEMATIES

1. On prépare un cocktail d'anticorps (15 µl de glyco A -FITC + 5 µl de CD59-PE + 180 µl de PBS), puis on agite délicatement le culot avec le vortex, et on conserve le tube fermé à + 4° C et à l'abri de la lumière.

2. Faire un frottis sanguin coloré au MGG

3. Prendre (10 µl de sang total + 1 ml de PBS), on agite délicatement le culot avec le vortex.

4. On prépare 02 tubes :

- i) dans le tube 1 et 2 : mettre 50 µl de sang lavé.
- ii) dans le tube 2 : mettre 20 µl du cocktail d'anticorps, puis on mélange délicatement avec la pipette.

5. Incubation pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante.

6. On agite délicatement le culot avec le vortex.

7. On lave avec 4 ml de PBS + racking, puis on centrifuge à 1000 T/min pendant 5 min

8. Puis on lave avec 4 ml de PBS + racking, puis on centrifuge à 1000 T/min pendant 5 min

9. Reprendre le culot dans 1 ml de PBS

f- L'ACQUISITION :

- il faut faire les réglages (setting) pour :
 - les globules blancs,
 - et les hématies, à l'échelle logarithmique,
- nombre d'événements pour les hématies :

- 100 000 événements,
- nombre d'événements pour les globules blancs : 35 000 événements,
- nombre d'événements pour les globules blancs, si on utilise le FLEAR,
- pour une sensibilité de 1% : 5 000 événements,
- pour une sensibilité de 0,01 % : 250 000 événements,

5 - L'ANALYSE ET LA STRATEGIE DE FENETRAGE :

1) **Premier dot plot** : globules blancs : Pour définir les « gates » des granuleux et des monocytes

- **CD15/SSC ou CD33/SSC** (quand on utilise 3 couleurs)
- **CD45/SSC, suivi du CD33/SSC** (quand on utilise 4 couleurs)

2) **Deuxième dot plot** : globules blancs : **FSC/SSC**, en multicolor gating et en linéaire

3) puis analyse des autres dots plot (**CD14, CD66b, en biparamétrique et en monoparamétrique**)

4) **Premier dot plot** : hématies : **Glycophorine A/SSC**

5) **Deuxième dot plot** : hématies : **Glycophorine A- FITC / CD59-PE**

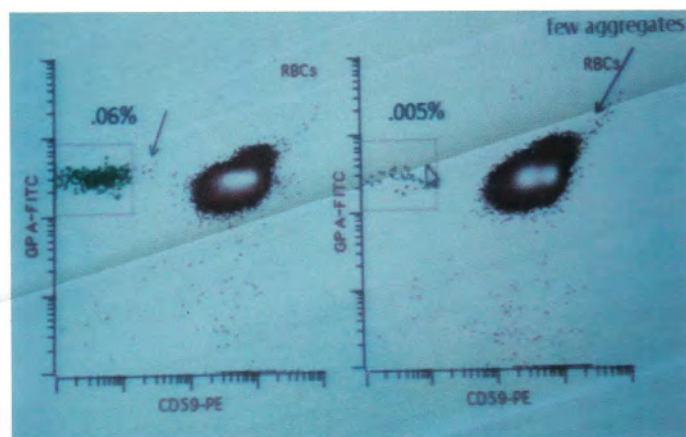


Figure 2 : clone HPN sur les hématies,
M J Borowitz, ESCCA 2010

6- LES COMBINAISONS D'ANTICORPS MONOCLONAUX

		COULEURS			
	CELLULES	1	2	3	4
3 couleurs	Granuleux	FLEAR	CD24	CD15	
3 couleurs	Monocytes	FLEAR	CD14	CD33	
4 couleurs	Granuleux	FLEAR	CD24	CD15	CD45
4 couleurs	Monocytes	FLEAR	CD14	CD33	CD45

Tableau I : Recommandations internationales des combinaisons d'anticorps, ESCCA 2010

7 - LE COMPTE RENDU DE CMF :

Un diagnostic d'HPN : nécessite impérativement de démontrer la présence d'un déficit $\geq 5\%$ avec 2 marqueurs différents et sur 2 types cellulaires différents.

- Dans le compte rendu, on doit obligatoirement préciser les (%) du type I, du type II, et du type III.
- On doit dire « présence d'un clone HPN de « X »% sur « X » populations.

8 - CONCLUSION :

Le diagnostic d'HPN en Algérie ne pose guère de problème depuis les progrès de la cytométrie en flux et la mise en place de centres de diagnostics.

Pour une meilleure standardisation de la technique, le Groupe Algérien de Cytométrie (GAC) a adopté un protocole simple, pratique et harmonisé, pour tous les laboratoires d'immunophénotypage, afin d'éviter les erreurs de diagnostic et de pouvoir faire des contrôles de qualité externes inter laboratoires.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Strubing P. Paroxysmale haemoglobinurie. Dtsch Med Wochenschr 1882; 8:1-3.
- 2- Enneking J. Eine neue form intermittierender haemoglobinurie (haemoglobinuria paroxysmalis nocturia). Klin Wochenschr 1928; 7:2045.
- 3- 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.
- 4- Michael J. Borowitz, Fiona E. Craig, Joseph A. DiGiuseppe, Andrea J. Illingworth, Wendell Rosse, D. Robert Sutherland, Carl T. Wittwer, Stephen J. Richards . Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. Cytometry Part B: Clinical Cytometry 000B: 00-00 (2010).
- 5- Stephen J. Richards, Peter Hillmen. Advances in the laboratory diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Clinical and Applied Immunology Reviews 1 (2001) 315-330.



changing possibilities in haemophilia®

Nous avons plus de 4 000
personnes dédiées à la R&D afin
d'aider à améliorer la qualité
de vie des personnes atteintes
de maladies chroniques

S. Madene, F. Baracco, F.E. Nicolini, Y. Chelghoum, H. Labussiere,
S. Ducastelle, X. Thomas, M. Michallet.

Hopital Edouard Herriot Lyon.

RÉSUMÉ

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) connue de longue date, est une maladie rare, acquise et clonale de l'hématopoïèse, responsable essentiellement d'une hémolyse intra vasculaire liée à une sensibilité anormale des érythrocytes à l'action lytique du complément, et secondairement de complications qui peuvent être fatales notamment des thromboses et une insuffisance rénale.

Le traitement de l'HPN a longtemps été purement symptomatique et substitutif, incapable d'améliorer la qualité de vie des patients qui accumulaient au fil du temps diverses complications jusqu'à l'avènement de l'Eculizumab (Soliris*) qui, même s'il reste symptomatique, est ciblé contre la fraction C5 du complément, améliorant considérablement la qualité de vie des patients et permettant ainsi de changer l'histoire naturelle de cette maladie dans sa forme hémolytique.

Cet article qui relate un travail rétrospectif portant sur 11 patients atteints d'HPN et traités par eculizumab au centre hospitalier universitaire d'Edouard Herriot de Lyon sur une période d'un peu plus de deux ans, montre l'impact positif qu'a apporté ce traitement sur divers symptômes présentés par ces patients et par conséquent sur leur qualité de vie.

ABSTRACT

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare, acquired and clonal disorder of hematopoietic stem cell, responsible mainly of intra vascular haemolysis which is the result of the abnormal lytic action of the complement on the red cells; and secondary of fatal complications: thrombosis and renal failure.

Therapies of PNH were, for long years, symptomatic. The development of eculizumab (Soliris*), an anti complement C5 antibody in the treatment of this disease, allows to improve considerably the life quality of patients and change the natural history of PNH in its haemolytic form. This article studies a retrospective work in 11 PNH patients treated by eculizumab in the university hospital of Lyon on a period of time of two years,

and shows the positive impact of this therapy on various symptoms presented by these patients.

INTRODUCTION

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est une maladie rare, acquise, clonale de la cellule souche hématopoïétique liée à l'absence totale ou partielle des protéines d'ancrage (CD 55 et CD 59) secondaire à une mutation somatique du gène phosphatidylinositol glycan A (PIG-A) situé en Xp22. Il en résulte une sensibilité anormale des globules rouges à l'action lytique du complément, entraînant une hémolyse, essentiellement intra vasculaire qui représente la manifestation majeure de la maladie à côté d'autres symptômes (liés aux cytopénies, aux thromboses...etc.).

Le traitement de l'HPN a longtemps été symptomatique (transfusions, corticothérapie, vitaminothérapie...etc.), puis curatif par la greffe de cellules souches hématopoïétiques dans certaines conditions (donneur HLA compatible, état de la maladie...) au prix d'une morbidité et d'une mortalité considérables. (1). Malgré son caractère symptomatique, l'avènement de l'Eculizumab (Soliris*), anticorps monoclonal humanisé anti fraction C5 du complément, a permis une amélioration spectaculaire de la qualité de vie des patients atteints de cette maladie, vérifiée par des études cliniques internationales (étude pilote (2), étude TRIUMPH (3), et étude SHEPHERD (4)) qui ont prouvé l'efficacité de ce traitement dans la forme hémolytique de cette maladie.

Notre travail, concerne la prise en charge et les résultats obtenus chez 11 patients porteurs d'une HPN et traités par eculizumab.

PATIENTS ET METHODES

Notre étude concerne 11 patients porteurs d'HPN, tous diagnostiqués par cytométrie en flux (5), suivis dans le service d'hématologie de l'hôpital Edouard Herriot à Lyon, et traités par eculizumab de juillet 2007 à janvier 2010. Il s'agit de 4 femmes et 7 hommes avec un âge moyen au diagnostic de 46 ans (20-72) et ayant

tous des antécédents de transfusion. Les tableaux clinico-biologiques au diagnostic sont variables : anémie hémolytique (4 /11), aplasie médullaire associée à une anémie hémolytique (7/11), tableau digestif (douleurs abdominales) (2/11) et maladie thrombo-embolique (2/11). Le délai entre le début des symptômes et le diagnostic a été de 52 mois (8-104) dans 5 cas sur 11 présentant des manifestations extra hématologiques (dont une insuffisance rénale) retardant le diagnostic, et plus court, de quelques jours à 2 mois dans 6 cas sur 11 présentant une symptomatologie hématologique.

Deux semaines minimum avant la mise sous eculizumab, tous les patients ont été vaccinés contre le méningocoque et ont été prévenus et informés sur des signes éventuels d'infection par ce germe et la nécessité de consulter un médecin dès le début des symptômes.

Le traitement par eculizumab s'est fait selon les modalités habituelles en terme de posologie et de fréquence (6), soit à la phase initiale: 600 mg en perfusion de 25 à 45 minutes par semaine pendant 4 semaines puis 900 mg la 5ème semaine, puis à la phase d'entretien: 900 mg tous les 14 jours +/- 2 jours. Ce traitement est effectué obligatoirement en hospitalisation (de jour) sous la surveillance d'un médecin (hématologue ou interniste).

Les valeurs biologiques moyennes avant le début de l'Eculizumab sont : taux d'hémoglobine (Hb) (g/dl) = 8.3 (4.9-11.8), bilirubine (bili) (mg/l) = 4.0 (2.4-5.6), LDH (UI/l) = 3099 (589-5610), haptoglobine (hapto) (g/l) = 0.075 (0.05-0.1). (tableau I).

RESULTATS

- Les résultats biologiques après traitement sont notés sur le tableau II.

	Hb (g/dl) M (extrême)	PNH (G/l) M (extrême)	PLQ (G/l) M (extrême)	Bi (mg/l) M (extrême)	LDH (UI/l) M (extrême)	Hapto (g/l) M (extrême)
Avant Eculizumab	8.3 (4.9 - 11.8)	2.9 (1 - 4.8)	152 (24 - 280)	40 (24 - 56)	3099 (589 - 5610)	0.075 (0.05 - 0.1)

Tableau I : Valeurs biologiques moyennes avant traitement
(M = moyenne)

	Hb (g/dl) M (extrême)	PNH (G/l) M (extrême)	PLQ (G/l) M (extrême)	Bi (mg/l) M (extrême)	LDH (UI/l) M (extrême)	Hapto (g/l) M (extrême)
Après Eculizumab	11.3 (8 - 14.6)	2.4 (1.2 - 3.6)	101.5 (31 - 172)	34 (14 - 54)	600 (359 - 842)	inchangée

Tableau II : valeurs biologiques moyennes des patients après plusieurs semaines de traitement par Eculizumab (M = moyenne)

- Chez tous les patients, nous avons assisté à la régression des signes cliniques d'hémolyse, et à une nette diminution du taux des LDH à moins de 800 UI /l.

- Nette réduction des besoins transfusionnels chez 3 patients, et indépendance transfusionnelle chez 8 patients dont 3 ont normalisé leur taux d'hémoglobine.

- Pas d'impact sur les lignées granulocytaire et plaquettaire.

- L'impact sur la taille du clone est en cours d'étude (temps de traitement court chez certains patients).

- Aucun accident thrombotique n'est survenu sous eculizumab, et les deux patients avec antécédent de thrombose n'ont plus présenté d'accident.

- Disparition totale des douleurs abdominales.

- Régression de l'insuffisance rénale chez un patient.

- Meilleure qualité de vie chez tous les patients, avec reprise des activités personnelles et professionnelles quotidiennes.

- Pas d'effet indésirable majeur : 2 patients ont signalé quelques céphalées modérées, un autre présente des infections urinaires à répétition après plusieurs mois de traitement ; aucune infection méningococcique. (7)

- Il est à noter néanmoins que :

*chez un patient, nous avons dû arrêter rapidement le traitement car aggravation du tableau clinico-biologique avec évolution vers une aplasie médullaire sévère. Nous avons décidé d'effectuer une allogreffe géno-identique de moelle osseuse qui a abouti à une rémission complète de l'aplasie médullaire et de l'hémolyse et à un chimérisme total donneur durable.

*chez un autre patient, même tableau d'aggravation, mais le traitement a consisté en

l'association de Ciclosporine A et de sérum anti-lymphocytaire (SAL) (car absence de donneur HLA compatible) avec une amélioration des cytopénies ; et après poursuite de l'Eculizumab une indépendance transfusionnelle a été obtenue.

DISCUSSION

L'indépendance transfusionnelle (4), l'absence d'événement thrombotique (8), la disparition des douleurs (9), et l'amélioration de la qualité de vie sont les principaux résultats constatés, rejoignant ainsi les données des études sus citées (10).

Cependant, malgré ces remarquables résultats améliorant la vie des patients, il persiste souvent des signes d'hémolyse infra clinique faisant l'objet de nouvelles recherches scientifiques. De plus l'Eculizumab du fait de son action ciblée anti fraction C5 du complément n'a aucun impact sur les lignées granulocytaire et plaquettaire qui évoluent pour leur propre compte l'HPN étant une affection touchant la cellule souche hématopoïétique ce qui explique que chez nos patients le taux de globules blancs et de plaquettes a tendance à diminuer dans le temps et que chez deux de nos patients un tableau d'aplasie médullaire s'est développé sous traitement nécessitant chez l'un une allogreffe et chez l'autre un traitement immunosuppresseur.

Enfin, la fréquence du traitement par eculizumab, sa durée indéterminée, et sa forme injectable intra veineuse font de cette molécule un traitement cher et astreignant, amenant à penser à le développer en une forme plus simple et moins chère, sous cutanée par exemple, diminuant ainsi la facture pour les patients et la société.

CONCLUSION

La thérapie ciblée anti-fraction C5 du complément par eculizumab, est certes un traitement symptomatique et non curatif de l'HPN, mais reste le traitement de référence des formes hémolytiques et/ou thrombotiques permettant une régression des symptômes cliniques invalidants aboutissant à une récupération d'une vie très proche de la normale chez la majorité des patients.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Current status of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Matos-Fernandez NA, Abou Mourad YR, Caceres W, Kharfan-Dabaja MA. Biol Blood Marrow Transplant. 2009 Jun ; 15(6) :656-61.
- (2) Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, Cullen MJ, Richards SJ, Rollins SA, Mojcik CF, Rother RP. N Engl J Med. 2004 Feb 5;350(6):552-9.
- (3) The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socié G, Muus P, Roth A, Szer J, Elebute MO, Nakamura R, Browne P, Risitano AM, Hill A, Schrezenmeier H, Fu CL, Maciejewski J, Rollins SA, Mojcik CF, Rother RP, Luzzatto L. N Engl J Med. 2006 Sep 21;355(12): 1233-43.
- (4) Eculizumab, a terminal complement inhibitor, improves anaemia in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Schubert J, Hillmen P, Roth A, Young NS, Elebute MO, Szer J, Gianfaldoni G, Socié G, Browne P, Geller R, Rother RP, Muus P, TRIUMPH study investigators. Br J Haematol. 2008 Jun; 142(2):263-72.
- (5) Use of FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. Sutherland DR, Kuck N, Azcona-Olivera J, Anderson T, Acton E, Barth D, Keeney M. Am J Clin Pathol. 2009 Oct; 132(4):564-72.
- (6) FDA report: eculizumab (Soliris) for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Dmytrijuk A, Robie-Suh K, Cohen MH, Rieves D, Weiss K, Pazdur R. Oncologist. 2008 Sep;13(9):993-1000.
- (7) Eculizumab. Davies J. Am J Health Syst Pharm. 2008 Sep 1; 65(17):1609-15.
- (8) Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, Schrezenmeier H, Szer J, Brodsky RA, Hill A, Socié G, Bessler M, Rollins SA, Bell L, Rother RP, Young NS. Blood; 2007 Dec 1; 110(12):4123-8.
- (9) Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Hill A, Rother RP, Hillmen P. Haematologica. 2005 Dec; 90(12 Suppl):ECR40.
- (10) The role of complement inhibition in PNH. Hillmen P. Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 2008:116-23.

ALLOGREFFE MYELOABLATIVE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES GENO-IDENTIQUES REALISEES CHEZ 20 PATIENTS ATTEINTS D'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE

F. Mehdid, R. Ahmed Nacer, F. Harieche, M. Benakli, R. Belhadj, N. Rahmoune, M. Baazizi, D. Ait ouali, N. Aouanouk, F. Zerhouni, RM Hamladji

Service Hématologie- Greffe de moelle osseuse EHS – Centre Pierre et Marie Curie, Alger.

RESUME

L'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne (HPN) ou maladie de Marchiafava et Micheli est une hémopathie rare due à une expansion clonale d'une ou de plusieurs cellules souches hématopoïétiques portant une mutation somatique acquise du gène *PIG-A* (Phosphatidylinositol glycan de classe A). La maladie peut se manifester de novo (HPN dans sa forme hémolytique pure dite classique) ou peut accompagner une maladie médullaire dont essentiellement l'aplasie médullaire et plus rarement un syndrome myélodysplasique ou une myélofibrose. Dans l'histoire naturelle de la maladie, la médiane de survie des patients atteints d'HPN est aux alentours de 15 ans. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est la seule alternative thérapeutique curatrice de l'HPN aussi bien dans sa forme classique que dans sa forme avec aplasie médullaire. Nous rapportons dans cet article, les résultats de l'allogreffe de CSH géno-identiques réalisées chez 20 patients atteints de la maladie HPN dans sa forme avec aplasie médullaire sur une période de 59 mois (du 01 avril 2005 au 11 novembre 2009). Parmi les complications principales liées à la procédure de greffe : un rejet secondaire du greffon est observé chez 2 patients (10%) à J30 et J60, documenté par l'étude du chimérisme lors de l'installation de la pancytopenie, dont un patient est vivant après reprise d'une hématopoïèse normale après institution d'un boost CSP, une GVHD aiguë de grade II-IV est observée chez 8 patients (40%), une GVHD chronique chez 4 patients (23,5%) dont 2 extensives. Trois patients sont décédés (J58, J77, J101) de cause liée à la procédure (TRM, transplant related mortality, : 15%) par GVHD aiguë grade IV de localisation digestive pour 2 patients et hépatique pour un patient. La survie actuarielle globale est de 85% et la survie sans événements de 73,7%. Ces résultats sont satisfaisants à confirmer à long terme.

Mots clés.

Hémoglobinurie paroxystique nocturne, Aplasie médullaire, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

INTRODUCTION

L'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne (HPN) ou maladie de Marchiafava et Micheli est une hémopathie rare due à une expansion clonale (1) d'une ou de plusieurs cellules souches hématopoïétiques portant une mutation somatique acquise du gène *PIG-A* (Phosphatidylinositol glycan de classe A). Le gène *PIG-A* est essentiel pour la biosynthèse de glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) qui sert d'ancrage à de nombreuses protéines membranaires (GPI-AP) exprimées sur les cellules de l'organisme. Parmi celles-ci on retrouve deux protéines, le CD55 et CD59, qui sont essentielles dans la protection des hématies de la destruction par le système complément. La perte de ces protéines membranaires inhibitrices du complément est responsable de l'hémolyse intra vasculaire. L'hémoglobine libre plasmatique va provoquer un dérèglement du métabolisme intra vasculaire de l'oxyde nitrique, en diminuant sa biodisponibilité, qui va contribuer à de nombreuses manifestations cliniques : dystonie des muscles lisses (dysphagie, douleurs abdominales, dysfonction érectile), insuffisance rénale et complications thrombo-emboliques graves (syndrome de Budd Chiari, intra abdominales, intra cérébrales) (2).

La maladie peut se manifester de novo (HPN dans sa forme hémolytique pure dite classique) avec une tendance à un large pourcentage de cellules GPI-AP déficientes détectées en cytométrie en flux ou peut accompagner une maladie médullaire dont essentiellement l'aplasie médullaire et plus rarement un syndrome myélodysplasique ou une myélofibrose. Sur le plan de la classification de la maladie, on oppose l'HPN classique à 2 autres formes de la maladie : d'une part, l'HPN survenant dans le contexte d'une maladie médullaire avec présence d'une hémolyse et, d'autre part, l'HPN en association à une maladie médullaire où l'hémolyse est absente (HPN dite subclinique) et

une petite population de cellules hématopoïétiques GPI-AP déficientes est détectée par cytométrie en flux. Dans l'histoire naturelle de la maladie, la médiane de survie des patients atteints d'HPN est aux alentours de 15 ans. La mortalité est liée aux complications thrombotiques mais aussi aux complications de l'insuffisance médullaire, de l'insuffisance rénale et leucémie aiguë (3).

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est la seule alternative thérapeutique curatrice de l'HPN (4) aussi bien dans sa forme classique que dans sa forme avec aplasie médullaire. Nous rapportons dans cet article, les résultats de l'allogreffe de CSH géno-identiques réalisées chez 20 patients atteints de la maladie HPN dans sa forme avec aplasie médullaire.

MATERIEL ET METHODES

Cette étude est rétrospective incluant 20 patients atteints de la maladie HPN ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH géno-identiques sur une période de 59 mois (du 01 avril 2005 au 11 novembre 2009). L'âge médian des patients est de 24 ans (15 à 34 ans) avec une prédominance masculine (M/F : 15/3 ; sex ratio 3). Le diagnostic de la maladie HPN et l'importance du clone HPN ont été établis par cytométrie en flux (Facs Calibur – 3 couleurs, Becton Dickinson) montrant un clone de type II à un taux moyen de 23,8% (7 à 78) chez 18 patients et un clone de type III chez 2 patients à des taux de 83% pour l'un et 100% pour l'autre. Tous les patients présentaient un tableau d'aplasie médullaire au moment du diagnostic dont un patient avec des signes évidents d'hémolyse intra vasculaire et un autre patient avec une complication thrombotique à type de Budd Chiari. Tous les patients ont été transfusés et 3 patients ont reçu plus de 20 transfusions sanguines. Le statut sérologique pré greffe des couples receveurs/donneurs (R/D) a révélé une sérologie CMV (IgG-IgM) positive chez tous les patients et 18 donneurs (R+/D+ : 18 ; R+/D- : 2), une sérologie hépatite B positive chez 2 patients qui ont bénéficié d'une prophylaxie par des immunoglobulines anti HbS et une sérologie D+/R- pour la toxoplasmose chez 5 couples D/R et les 5 patients ont reçu des mesures prophylactiques post greffe avec du Bactrim. Le délai diagnostic-

greffe est en moyenne de 16,3 mois (2 à 120) (tableau I).

Paramètres	Patients (n = 20)
Age médian en années (extrême)	24 (15 – 34)
Sex ratio (M/F)	3
Nbre unités sang transfusé pré greffe	
> 20	3 (15%)
< 20	17 (85%)
Tableaux cliniques	
AM sans Hémolyse	18
AM + Hémolyse	1
AM + Sd Budd Chiari + Hémolyse	1
Diagnostic par cytométrie en flux	20
Délai diagnostic-greffe en mois (extrême)	16,3 (2–120)

Tableau I : Casuistique des patients (AM : Aplasie Médullaire)

Les 20 patients ont été placés dans une chambre à flux laminaire, après pose d'un cathéter central, et le conditionnement utilisé a consisté à une chimiothérapie seule. Dix sept patients ont bénéficié de cyclophosphamide seule à la dose de 200 mg/Kg (50 mg/Kg/j x 4, de J-6 à J-2) et 3 patients de l'association Natulan 37,5 mg/Kg (12,5 mg/Kg/j x 3, J-6 à J-7, cyclophosphamide 200 mg/Kg (50 mg/Kg/j x4, J-6 à J-3) et Thymoglobuline (Genzyme) 15mg/Kg (5 mg/Kg/j de J-5 à J-3). La prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD : graft versus host disease) a associé ciclosporine (IV : 3 mg/Kg/j) et méthotrexate (15 mg/m² J1 et 10mg/m² J3 et J6).

Les greffons utilisés sont des cellules souches périphériques (CSP) obtenus par cytophérèse (Cobe Spectra, Gambro) à J5 et J6 après mobilisation des cellules chez les donneurs par G-CSF seul à la dose de 10 µg /Kg/j de J1 à J5. Les donneurs dont l'âge moyen est de 20 ans (4,5 – 29) et sex ratio 0,66 (8 M et 12 F) sont géno-identiques issus de la fratrie des patients respectifs. La qualité des greffons par la quantification du taux de cellules CD34+ est faite par cytométrie en flux. Vingt et un greffons dont un boost ont été utilisés chez 20 patients avec une moyenne de cellules CD34+ : 4,29 10⁶/Kg receveur (1,83 – 7,67) et une moyenne de cellules mononucléées 9,03 10⁶/Kg receveur (6,56 – 17,5) (tableau II).

Procédure allogreffe/greffons	Patients (n = 20)
Chambre à flux laminaire	20
Conditionnement	
Cyclophosphamide 200 mg/Kg	17
Natulan+Cyclophosphamide+Thymoglobuline	3
Prophylaxie GVHD	
Ciclosporine + Méthotrexate	20
Source et nombre de greffons utilisés	
CSP génoidentiques	20
Nombre greffons	21 (avec un boost)
Qualité des greffons CSP	
Moyenne cellules CD34+ (x 10 ⁵ /Kg)	4,29 (1,83–7,67)
Moyenne cellules mononucléées(x 10 ⁸ /Kg)	9,04 (6,56–17,5)

Tableau II : Procédure d'allogreffe et greffons

Le chimérisme chez le patient est analysé, à J30, J60 et J90, en biologie moléculaire par la méthode STR microsatellites (STR-PCR, Gene Scan Applied Biosystem). La date d'évaluation des résultats est le 20 février 2010 avec un recul minimum de 4 mois et maximum de 59 mois. Les courbes de survie globale et de survie sans événements sont calculées par la méthode de Kaplan Meier. La recherche de l'antigénémie CMV (pp60), révélant une réactivation virale à CMV et permettant ainsi un traitement pré emptif quand elle est positive, est réalisée par immunofluorescence dès sortie d'aplasie toutes les semaines jusqu'à J100.

RESULTATS

La prise du greffon a été observée chez tous les patients. Le délai médian de sortie d'aplasie après greffe est de 14 jours (11 à 19). Tous les patients ont nécessité un support transfusionnel avant la prise du greffon par des culots globulaires chez 19 patients avec en moyenne 4,25 unités/patient (1 à 8) et par des concentrés unitaires plaquettaires chez les 20 patients avec une moyenne de 4,67 unités/patients (1 à 8) (tableau III). Tous les patients ont présenté des épisodes fébriles ayant cédé sous antibiothérapie : 28 épisodes fébriles pour 20 patients avec une moyenne de 1,4 épisodes /Pt ; 12/28 épisodes sont documentés (43,9%) dont 10 (35,7%) microbiologiquement et 2 cliniquement (7,2%).

La durée moyenne d'hospitalisation en unité stérile a été de 24,5 jours (18 à 33).

-Délai de sortie d'aplasie post greffe

J PN >500 / mm ³	14 (11- 19)
J PN >1000 / mm ³	15 (11- 21)
J Plaquettes >20000 / mm ³	12 (10-21)
J Plaquettes >50000 / mm ³	13 (11-19)

-Support transfusionnel durant aplasie

-Nombre de patients transfusés

Culots globulaires	19
Culots unitaires plaquettaires	20

-Nombre d'unités moyen par patient

Culots globulaires	4,25 (1 - 8)
Culots unitaires plaquettaires	20 (1 - 8)

Durée moyenne d'hospitalisation en jours 24,7 (18–33)
(unité stérile)

Tableau III : Prise du greffon et support transfusionnel

Dix sept patients sont vivants (85%) dont 16 patients avec prise du greffon (80%) avec un délai médian de suivi de 17 mois (4 à 59) et un chimérisme moyen de 98,3% (95 – 100) à J30, 100% à J60 et J90 (tableau IV).

	Nombre patients	%
Vivants	17	85
Avec prise du greffon	16	80
Décédés	3	15
Chimérisme (cell. Donneur)	16	
J30		98,5 (95- 100)
J60		100
J90		100

Tableau IV : Devenir des patients et chimérisme des 16 patients avec prise du greffon avec une médiane de suivi de 17 mois (4 – 59).

Un rejet secondaire du greffon est observé chez 2 patients (10%) à J30 et J60, documenté par l'étude du chimérisme lors de l'installation de la pancytopenie, dont un patient est vivant après reprise d'une hématopoïèse normale après institution d'un boost CSP (CD34+ = 8,84 10⁶ / Kg) à partir du donneur initial sans conditionnement et un patient vivant en reconstitution autologue actuellement sous ciclosporine et dépendance transfusionnelle.

Parmi les complications principales liées à la procédure de greffe (tableau V), une GVHD aiguë de grade II-IV est observée chez 8 patients (40%), une GVHD chronique chez 4 patients (23,5%) dont 2 extensives. Sept patients (35%) ont présenté une réactivation du cytomégalovirus, documentée par la détection d'une antigénémie CMV positive, et bénéficié d'un traitement

préemptif par ganciclovir avec succès.

Complications principales	Evaluables	Nombre de patients	
		Complications	%
Infections documentées	28 épisodes	12	43,9
GVH aiguë	20	8	40
I		-	
II-IV		8	
GVH chronique	17	4	23,5
Limitée		2	
Extensive		2	
Réactivation CMV	20	7	35
Rejet du greffon	20	2	10

Tableau V : Complications principales post greffe

Trois patients sont décédés (J58, J77, J101) de cause liée à la procédure (TRM, transplant related mortality, : 15%) par GVHD aiguë grade IV de localisation digestive pour 2 patients et hépatique pour un patient.

La survie actuarielle globale est de 85% (figure 1) et la survie sans événements de 73,7% (figure 2).

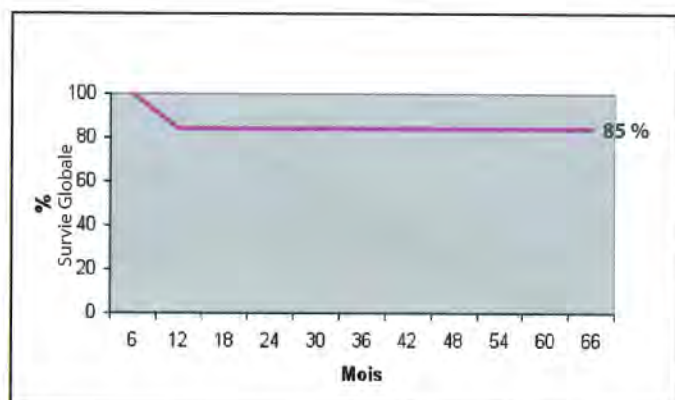


Figure 1 : Survie actuarielle globale (SG) des 20 patients atteints de HPN/Aplasie ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH (SG : 85%)

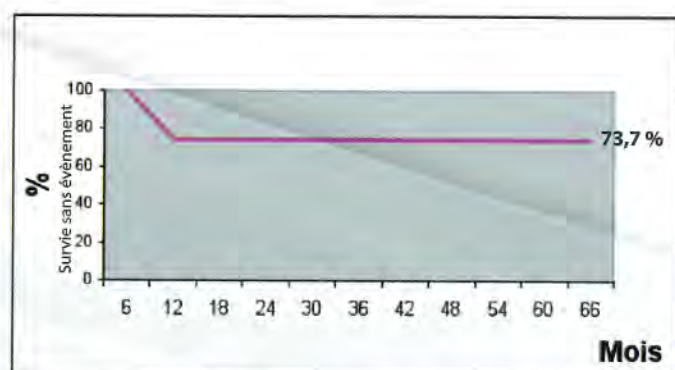


Figure 2 : Survie sans événement (SSE) des 20 patients atteints de HPN/Aplasie ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH (SSE : 73,7%)

DISCUSSION

L'allogreffe de CSH reste le seul traitement curatif de l'HPN. En effet la procédure permet l'éradication du clone de la maladie (2). Cependant la morbidité et la mortalité liées à la procédure ne permettent qu'une survie à long terme de l'ordre de 50 à 60%. Une étude de l'IBMTR (International Bone Marrow Transplantation) a rapporté une survie à 2 ans de 56% chez 48 patients, avec un âge médian de 28 ans, atteints d'HPN après allogreffe myéloablatif géno-identique réalisées entre 1978 et 1995 ; la majorité des décès dans cette étude est survenue dans la première année post greffe (5, 6, 7). Le groupe EBMT (European Bone marrow Transplantation) a rapporté une survie, chez des sujets jeunes avec une médiane d'âge de 30 ans, à 5 ans de 70% en incluant dans cette étude 54% de formes classiques de la maladie HPN. Le rejet du greffon a été observé chez 6% des patients, la GVH aiguë et chronique chez 15% et 20% respectivement (7, 8).

Notre étude rétrospective incluant 20 patients, âge médian de 24 ans, montre une survie globale de 85% et une survie sans événements de 73,7% avec une médiane de suivi des patients de 17 mois (4-59). La prise du greffon a été observée chez tous les patients et un rejet secondaire du greffon est survenu chez 2 patients (10%) qui sont vivants dont l'un a repris une hématopoïèse normale après institution d'un Boost de CSP sans conditionnement. Quant aux complications majeures liées à la greffe on a noté la survenue d'une GVH aiguë grade II-IV chez 8 patients (40%) et une GVH chronique chez 4 patients (23,5%) dont 2 extensives. La TRM est faible de l'ordre de 15% en rapport avec le décès de 3 patients suite à une GVH aiguë grade II-IV.

Nos résultats sont satisfaisants et doivent être confirmés à long terme. Cependant nous observons un taux de GVH aiguë relativement élevé dans notre série pouvant être expliqué par le fait que l'on utilise un greffon à partir de CSP. Concernant le conditionnement, si la plupart des études ont réalisé un conditionnement myéloablatif, des succès de greffe après un conditionnement non myéloablatif ont été rapportés (4, 9) suggérant l'existence d'un effet "graft versus HPN". Dans notre étude, nous avons utilisé chez 17/20 patients un allègement du conditionnement avec succès comportant du cyclophosphamide seul à 200 mg/Kg sans associer le sérum anti lymphocytaire. Actuellement, la place de l'allogreffe dans l'HPN est discutée dans certaines formes de la maladie depuis l'introduction de l'Eculizumab. L'Eculizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui bloque la fraction C5 du complément. Il réduit de façon effective l'hémolyse intra

vasculaire et le risque de thrombose. Il est d'une bonne indication dans les formes hémolytiques de la maladie et en cas de thrombose (10, 11). Cependant il est inefficace dans les formes aplasiques puisqu'il n'a aucune action sur le clone HPN. Plusieurs inconvénients entourent son utilisation parmi lesquels son coût cher et son utilisation à vie et par voie injectable. Ainsi, l'indication de l'allogreffe reste indiscutable dans les formes aplasiques mais discutée en fonction de la disponibilité de l'Eculizumab dans les autres formes de la maladie. Dans les pays développés, la forme classique et la forme thrombotique sont proposées à l'allogreffe en cas d'échec à l'Eculizumab. Dans les pays en voie de développement, comme l'Algérie, l'allogreffe reste une indication dans la forme classique transfusion dépendante et dans les formes thrombotiques.

CONCLUSION

L'allogreffe de CSH reste la seule alternative curatrice dans l'HPN. Son indication dans les formes aplasiques reste indiscutable comme en témoignent nos résultats très satisfaisants à confirmer à long terme.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 – Oni SB, Osunkoya BO and Luzzatto L
Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria : Evidence of Monoclonal Origin of Abnormal Red Cells Blood 1970; 36 : 145 – 152
- 2 – Charles J. Parker, Russel E. Ware
Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria
Hematology 12th Edition Wintrob's 2009 : 998 – 1020
- 3 – Parker C, Omine M, Richards , Nishimura JI, et al
Diagnosis and management of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria - Blood 2005; 106 : 3699 – 3709
- 4 - Antin JH, Ginsburg D, Smith BR, Nathan DG, Orkin SH and Rapoport JM
Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : Eradication of the PNH clone and documentation of complete lymphohematopoietic engraftment.
Blood 1985; 66 : 1247 – 1250
- 5 – Saso R, Marsh J, Cevreskou L, Szer J, Gale RP, Rowlings PA, et al
Bone marrow transplants for Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria - Br J Haematol 1999; 104 : 392 – 396
- 6 – Roberts A. Brodsky
Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria - Haematologica 2010; 95 (2) : 855 - 856
- 7 – Robert A. Brodsky
How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Blood 2009; 113 (26) : 6522-6527
- 8 – Peffault de Latour R, Schrezenmeier H, Mary JY, et al
Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : an ongoing joint study of the AAWP EBMT group and French Society of hematology (abstract) Blood 2008 ; 112 : abstract 1181
- 9 – Suenega K, Kanda Y, Nijja H, et al
Successful application of non myeloablative transplantation for paroxysmal Nocturnal hemoglobinuria
Exp Hematol 2001; 29 : 639 – 642

10 – Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, et al
Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria Blood 2008; 111 : 1840 – 1847

11 – 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 (12) : 4123 - 4128

ERRATUM

Une erreur s'est glissée lors de la parution du numéro 03 de la revue (Septembre 2010) au sein de l'article : Application du caryotype et de l'hybridation in situ fluorescente (FISH) dans la leucémie myéloïde chronique (S. Taoussi et al) en page 22 (Chapitre résultats et sous chapitre illustration par deux cas particuliers) sur les figures 5 et 6.

Ci dessous, nous reproduisons la rectification de ces 02 figures.

Illustration par deux cas particuliers : LMC acutisées incluses dans l'évaluation ci dessus

Dans un cas (Figure 5), présence du chromosome Ph1 dans 30 mitoses en caryotype confirmé par la FISH qui met en évidence en plus une anomalie cryptique : ins (22 ; 9).

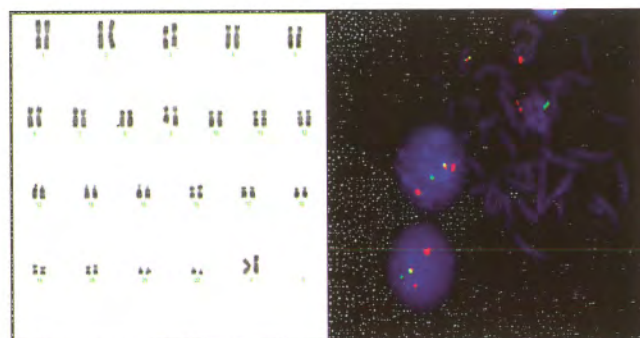


Figure 5 : chromosome Philadelphie et insertion cryptique (9 ; 22) en FISH.

Dans le deuxième cas (Figure 6), présence du Ph1 en deux copies (double Ph1) en caryotype conventionnel confirmé par la FISH.

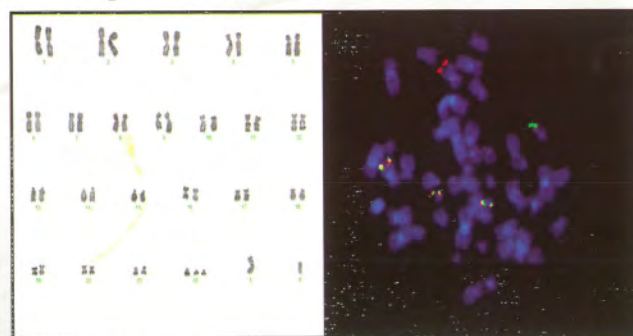


Figure 6 : double Ph1 en caryotype et FISH.

FEIBA

Factor VIII Inhibitor Bypassing Activity

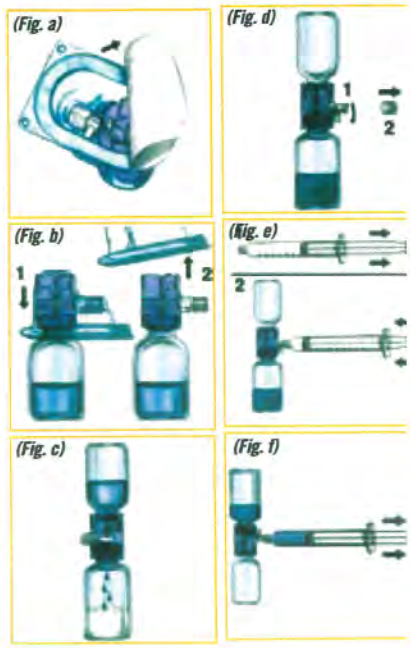
Facteurs de coagulation ayant une activité court-circuitant l'inhibiteur du Facteur VIII

Hémophiles avec inhibiteur **Pour plus de liberté !**

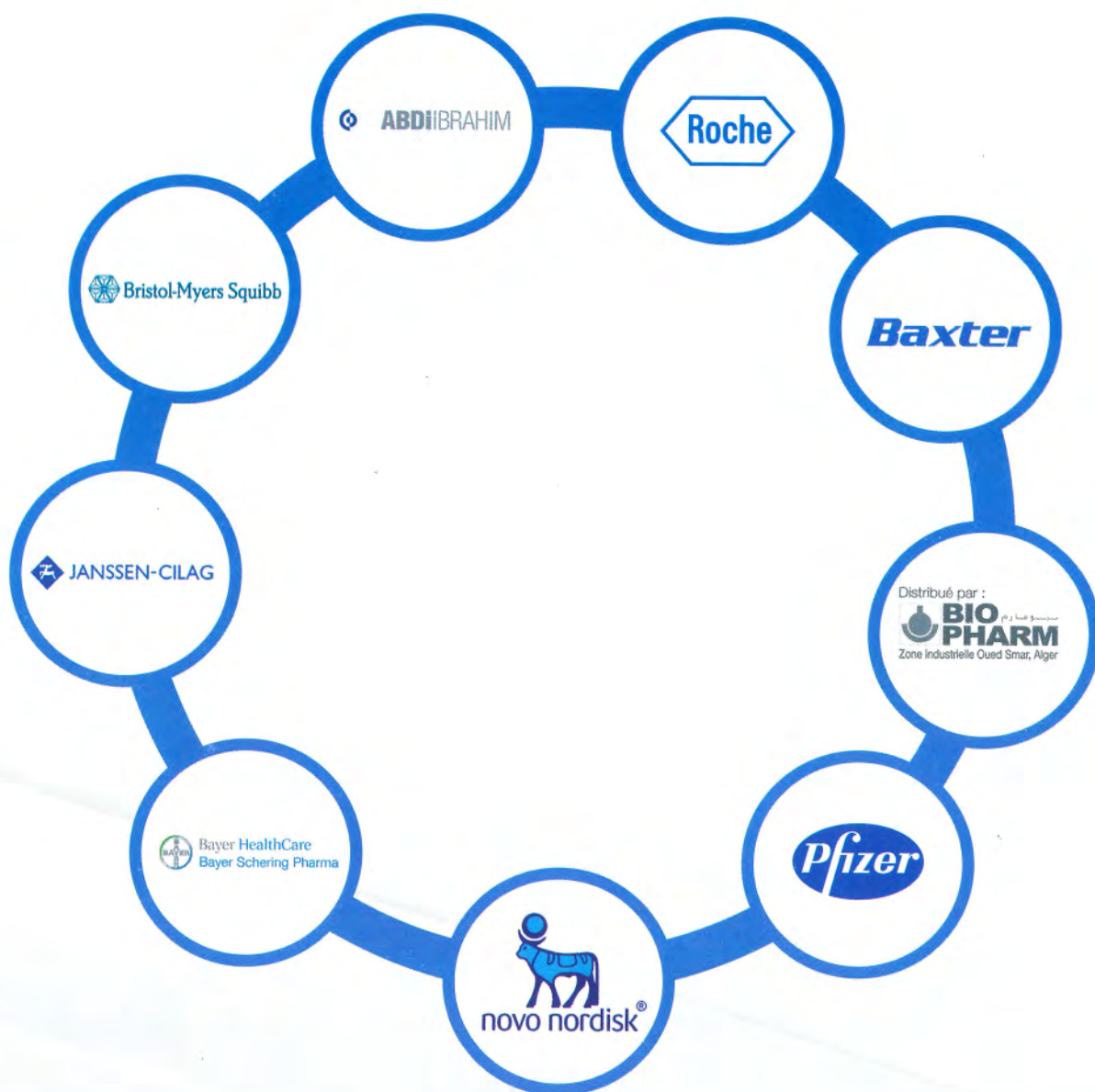
- Traitement et prévention des hémorragies et en situation chirurgicale dans le déficit constitutionnel en facteur VIII (hémophilie A), chez les patients "forts répondeurs" ayant développé un inhibiteur dirigé contre le facteur VIII ;
- En cas d'échec par le facteur VIIa, traitement et prévention des hémorragies et en situation chirurgicale dans le déficit constitutionnel en facteur IX (hémophilie B), chez les patients "forts répondeurs" ayant développé un inhibiteur dirigé contre le facteur IX ;
- Traitement des hémorragies et en situation chirurgicale chez les patients avec hémophilie acquise par auto-anticorps anti-facteur VIII.

FEIBA

1. DENOMINATION DU MEDICAMENT FEIBA 500 U/20 ml, poudre et solvant pour solution injectable **2. COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE** Facteurs de coagulation ayant une activité court-circuitant l'inhibiteur du Facteur VIII 500 U/Contenus dans une quantité de protéines totales* de 400 mg pour 20 ml. *Une unité FEIBA est définie comme la quantité de substance active qui permet de raccourcir le temps de céphaline activé (TCA) d'un plasma de référence à haut titre d'inhibiteur de Facteur VIII, de 50 % par rapport à la valeur du contrôle - c'est à dire que si le TCA du plasma inhibiteur est de 100 secondes, l'unité est la quantité de produit actif qui amène le TCA à 50 secondes - lorsque des volumes équivalents d'une solution de FEIBA et du plasma inhibiteur sont utilisés. *compréhension notamment les facteurs de coagulation II, IX et X, principalement sous forme non activée, du Facteur V principalement sous forme activée, du Facteur VIII (FVIII:Ag) à une concentration inférieure à 0,1 U par unité FEIBA. Les facteurs du système kallikréine-kinine ne sont pas décelables ou n'existent qu'à l'état de traces. Pour la liste complète des excipients, cf 6.1. **3. FORME PHARMACEUTIQUE** Poudre et solvant pour solution injectable. **4. DONNEES CLINIQUES 4.1. Indications thérapeutiques** Ce médicament est indiqué : dans le traitement et la prévention des hémorragies et en situation chirurgicale dans le déficit constitutionnel en facteur VIII (hémophilie A), chez les patients «forts répondeurs» ayant développé un inhibiteur dirigé contre le facteur VIII; en cas d'échec par le Facteur VIIa, dans le traitement et la prévention des hémorragies et en situation chirurgicale dans le déficit constitutionnel en facteur IX (hémophilie B), chez les patients «forts répondeurs» ayant développé un inhibiteur dirigé contre le facteur IX; dans le traitement des hémorragies et en situation chirurgicale chez les patients avec hémophilie acquise par auto-anticorps anti-facteur VIII. **4.2. Posologie et mode d'administration** La posologie est indiquée pendant du titre de l'anticorps du patient. Quels que soient le type et la sévérité de l'hémorragie, la posologie recommandée sera dans tous les cas de 80 U/kg 2 à 3 fois/jour sans dépasser 240 U/kg par 24 heures et 100 U/kg par injection. Dans le cas des hémorragies graves: le traitement nécessite la surveillance clinique et biologique attentive du patient avec en particulier, pour les hémorragies non extériorisées, le contrôle régulier de la NFS; Dans le cas d'interventions chirurgicales: l'administration sera faite immédiatement avant l'intervention puis toutes les 8 heures jusqu'à la cicatrisation. L'expérience avec FEIBA chez les patients présentant une hémophilie acquise par auto-anticorps anti-facteur VIII est limitée aux interventions chirurgicales mineures. **Surveillance du traitement:** Le plus souvent, les résultats des tests de coagulation ne sont pas corrélés avec les résultats cliniques, et par conséquent, ne peuvent être utilisés que de façon limitée pour la surveillance du traitement. Toutefois, le raccourcissement du temps de Quick est un indicateur de l'effet biologique sur la coagulation. Pour un temps de Quick basal normal, celui obtenu après injection ne doit pas être inférieur à 8 secondes. **Mode d'administration** Le produit doit être administré par voie intraveineuse après reconstitution avec le diluant fourni (selon les modalités décrites dans la rubrique Précautions particulières d'élimination et de manipulation). FEIBA doit être exclusivement injecté par voie intraveineuse lente sans dépasser un débit de 2 U/kg/min. La solution reconstituée est claire ou légèrement opalescente. Ne pas utiliser de solutions présentant un aspect non homogène ou contenant un dépôt. Des données recueillies chez 67 hémophiles congénitaux, dont 65 hémophiles A et 2 hémophiles B, pour 1143 épisodes hémorragiques ou événements traités par FEIBA lors de 1079 séquences thérapeutiques, dont 720 (67 %) effectués à domicile, ont montré la possibilité d'utiliser FEIBA à domicile avec une efficacité et une tolérance comparables à des traitements effectués en milieu hospitalier. Le traitement à domicile permet de traiter précocement les épisodes hémorragiques et augmente donc les chances d'une résolution plus rapide et de séquelles moins importantes. La possibilité d'utiliser FEIBA à domicile peut être envisagée pour le traitement d'hémorragies mineures à modérées (hémarthroses, hématomes ou saignements cutanéo-muqueux) ou les traitements préventifs, en accord avec le Centre de Traitement Régional de l'Hémophilie qui assure le suivi du patient et dans les conditions suivantes: - Une formation à l'auto-traitement doit avoir été dispensée au patient par l'équipe soignante d'un Centre de Traitement Régional des Hémophiles; - Le patient doit avoir été jugé apte par cette équipe à se traiter ou à se faire traiter à domicile; - Le traitement à domicile doit être réalisé en étroite collaboration avec le Centre Spécialisé au sein duquel le patient est suivi; - Au-delà de la 4^e injection ou de 3 jours de traitement, le patient doit contacter le Centre Spécialisé qui le suit; - Toutes les injections de FEIBA doivent être notées sur le carnet de l'hémophile et rapportées au médecin spécialisé dans le traitement de l'hémophilie. **4.3. Contre-indications** hypersensibilité à l'un des constituants de la préparation; - signes biologiques et/ou cliniques de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) signes biologiques, histologiques et/ou cliniques spécifiques d'une insuffisance hépatique (qui majorerait le risque de coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) en raison de la clairance diminuée des facteurs actifs) - risque potentiel de complications thrombotiques, notamment cardio-vasculaires. **4.4. Mises en garde spéciales et précautions d'emploi** - Le traitement substitutif de l'hémophilie avec inhibiteur doit être pris en charge et/ou surveillé par un médecin ayant l'expérience du traitement de l'hémophilie. - Ne pas dépasser la dose de 100 U de FEIBA par kg et par injection. - Dans le cas de traitements d'hémorragies mineures à modérées (hémarthrose hématomes ou hémorragies cutanéo-muqueuses) ou de traitements prophylactiques administrés à domicile en accord avec le Centre de Traitement Régional de l'Hémophilie qui assure le suivi du patient, les conditions suivantes doivent être appliquées: - Une formation à l'auto-traitement doit avoir été dispensée au patient par l'équipe soignante d'un Centre de Traitement Régional des Hémophiles; - Le patient doit avoir été jugé apte par cette équipe à traiter ou à se faire traiter à domicile; - Le traitement à domicile doit être réalisé en étroite collaboration avec le Centre Spécialisé au sein duquel le patient est suivi; - Au-delà de la 4^e injection ou de 3 jours de traitement, le patient doit contacter le Centre Spécialisé qui le suit; - Toutes les injections de FEIBA doivent être notées sur le carnet de l'hémophile et rapportées au médecin spécialisé dans le traitement de l'hémophilie. Le risque de survenue d'effets indésirables à type de CIVD ou de thrombose augmente pour des doses journalières supérieures à 240 U ou pour des doses de 100 U de FEIBA par kg de poids corporel et par injection et notamment répétées pendant plusieurs jours: les signes cliniques et biologiques d'une CIVD et les symptômes d'une ischémie coronarienne aiguë devront être attentivement recherchés immédiatement et à quelques jours du début du traitement. - En cas de modification de la pression artérielle, de pouls irrégulier, de dyspnée, de douleurs thoraciques ou de toux, interrompre immédiatement l'injection de FEIBA. Les réactions allergiques sévères de type anaphylactique imposent l'arrêt immédiat du traitement. En cas de choc, le traitement symptomatique de l'état de choc devra être instauré. - Le contrôle in-vitro de l'efficacité de FEIBA donne un temps de Quick raccourci, toutefois, pour un temps de Quick basal normal, ce obtenu après injection de FEIBA ne doit pas être inférieur à 8 secondes. - Une thrombopénie peut être responsable d'une inefficacité du traitement par FEIBA. Un contrôle de la numération des plaquettes est souhaité avant et cours de traitement. - Etant donné le risque de relance anamnétique de l'inhibiteur anti-facteur VIII (dans 10 à 30 % des cas) ou anti-facteur IX, le titre de l'inhibiteur doit être régulièrement surveillé. - Le risque d'accider thrombo-emboliques nécessite une surveillance biologique stricte à la recherche des premiers signes d'une éventuelle CIVD et la prévention des complications thrombo-emboliques selon les recommandations en usage devra être instaurée, en particulier chez les patients avec antécédents cardiovasculaires. Dans chacune de ces situations, le bénéfice du traitement par FEIBA doit être évalué par rapport au risque de complications. FEIBA 500 U/20 ml poudre et solvant pour solution injectable contient 81,75 mg de sodium par flacon de 20 ml. En tenir compte en cas de régime hyposodé. Les mesures habituelles de prévention du risque de transmission d'agents infectieux par les médicaments préparés à partir de sang ou de plasma humain comprennent la sélection clinique des donneurs, la recherche des marqueurs spécifiques d'infection sur chaque don et sur les mélanges de plasma ainsi que la mise en œuvre dans le procédé de fabrication d'étapes efficaces pour l'inactivation/élimination virale. Cependant, lorsque des médicaments préparés à partir de sang ou de plasma humain sont administrés, le risque de transmission d'agents infectieux ne peut pas être totalement exclu. Ceci s'applique également aux virus inconnus ou émergents ou autres types d'agents infectieux. Les mesures prises sont considérées comme efficaces vis-à-vis des virus enveloppés tels que le VIH, le VHB et le VHC. Les mesures prises peuvent être d'efficacité limitée vis-à-vis des virus non enveloppés tels que le VHA et le parvovirus B19. L'infection par le parvovirus B19 peut être sévère chez les fœtus et chez les personnes atteintes de certains types d'anémies ou d'un déficit immunitaire. Une vaccination appropriée (hépatites A et B) des patients recevant des facteurs de coagulation est recommandée. **4.5. Interaction avec d'autres médicaments et autres formes d'interactions** L'utilisation simultanée de FEIBA et d'antifibrinolytiques tel que l'acide epsilon-aminocaproïque doit être faite avec précaution et attentivement surveillée. **4.6. Grossesse et allaitement** Aucune étude expérimentale n'a été conduite chez l'animal lors de la grossesse et de l'allaitement. De plus, il existe un risque thrombotique élevé durant la grossesse. En conséquence, FEIBA ne doit être administré au cours de la grossesse et de l'allaitement qu'en cas de nécessité absolue. **4.7. Effets sur l'aptitude à conduire des véhicules et à utiliser des machines** Rien ne suggère que FEIBA diminue l'aptitude à conduire des véhicules ou à utiliser des machines. **4.8. Effets indésirables** Réactions d'hypersensibilité de type allergique telles que fièvre, poussée d'urticaire, malaise, nausées, ainsi que d'autres réactions anaphylactiques de gravité variable ont été rapportées chez les patients traités par FEIBA. En cas de choc, le traitement symptomatique de l'état de choc devra être instauré. La relance anamnétique des anticorps anti-facteur VIII et anti-facteur IX, du fait de la présence de ces facteurs dans FEIBA, peut être observée. Des accidents thrombo-emboliques peuvent être observés en cas d'injection de produits contenant des facteurs du complexe prothrombotique, notamment en cas de posologies élevées et/ou chez des patients à risque thrombotique. Il a été observé immédiatement ou à distance des signes biologiques et/ou cliniques de CIVD après injections de fortes doses de FEIBA (doses quotidiennes supérieures à 240 unités par kg), notamment répétées pendant plusieurs jours, (voir rubrique 4.4 'Mises en garde spéciales et précautions d'emploi'). De rares cas d'infarctus du myocarde ont été observés lors de traitement par FEIBA après administration de fortes doses et/ou après administration prolongée et/ou chez des patients ayant des facteurs de risque prédisposants. **4.9. Surdosage** Après un surdosage de FEIBA, il existe un risque élevé d'accidents thrombo-emboliques, de CIVD ou d'infarctus du myocarde. Si des signes en faveur de tels accidents apparaissent, il est nécessaire de suspendre l'administration de FEIBA. Si après l'arrêt d'administration du produit, l'état clinique ne normalise pas rapidement, les mesures thérapeutiques spécifiques devront être prises, en tenant compte du trouble de la coagulation sous-jacent. **5. PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES SANG ET ORGANES HEMATOPOIETIQUES (Substitut de coagulation court-circuitant le facteur VIII, B02BD03) 5.1. Propriétés pharmacodynamiques** L'activité de FEIBA est due à la formation d'une «activité coagulante court-circuitant l'action des facteurs anti-hémophiliques VIII et IX», induisant la coagulation à un moment où les facteurs VIII et IX ne sont plus nécessaires. Cette activité est fondée sur la présence des facteurs IX, X et VII activés qui se lient aux plaquettes pour former «le prothrombinase» à l'abri de l'antithrombine. **5.2. Propriétés pharmacocinétiques** La présence de plusieurs facteurs de coagulation dans FEIBA rend impossible l'étude cinétique du produit. **5.3. Données de sécurité préclinique** Aucune étude sur la toxicité par administration répétée n'a été réalisée (en raison du développement des anticorps chez les animaux). Aucune potentialité mutagène n'a été révélée sur cellules procaryotes (test d'Ames). **6. DONNEES PHARMACEUTIQUES 6.1. Liste des excipients** Poudre: chlorure de sodium et citrate de sodium. Solvant de reconstitution: eau pour préparations injectables. **6.2. Incompatibilités** FEIBA ne doit en aucun cas être mélangé avec d'autre produit et/ou médicament. Seuls les dispositifs d'injection/perfusion en plastique homologués peuvent être utilisés car l'adsorption des facteurs de coagulation dérivés du plasma humain sur les surfaces internes certains matériels de perfusion peut être responsable de l'échec du traitement. **6.3. Durée de conservation** 2 ans. Après reconstitution: une utilisation immédiate est recommandée. Toutefois, la stabilité a été démontrée pendant 3 heures à +25°C. **6.4. Précautions particulières de conservation** A conserver entre +2°C et +8°C (au réfrigérateur). Pendant la durée de conservation, le produit peut être conservé à une température ne dépassant pas +25°C pendant 1 mois maximum sans être à nouveau réfrigéré pendant cette période et doit être jeté s'il n'est pas utilisé au bout de ce mois. **6.5. Nature et contenu de l'emballage extérieur** 500 U de poudre en flacon (verre) + 20 ml de solvant en flacon (verre) munis de bouchons (chlorobutyle) avec une aiguille de transfert, une aiguille-filtre, une aiguille de perfusion et une seringue à usage unique (polypropylène), un nécessaire d'injection comprenant une tubulure avec une aiguille à ailette - boîte de 1 ou 500 U de poudre en flacon (verre) + 20 ml de solvant en flacon (verre) munis de bouchons (chlorobutyle) avec une aiguille de transfert, une aiguille-filtre, une aiguille de perfusion et une seringue à usage unique (polypropylène), un nécessaire d'injection comprenant une tubulure avec une aiguille à ailette - boîte de 1. **6.6. Précautions particulières d'élimination et de manipulation** Ne jamais utiliser les flacons dès la sortie du réfrigérateur et respecter les règles d'asepsie habituelles. Présentation avec aiguilles 1. Amener le flacon de solvant (eau pour préparations injectables) à température ambiante (<37°C). 2. Enlever les capsules des flacons de poudre et de solvant. 3. Nettoyer les bouchons avec une solution antiseptique. 4. Enlever l'embout protecteur couvrant l'une des extrémités de la double aiguille et l'enfoncer dans le bouchon du solvant. 5. Enlever l'embout protecteur couvrant l'autre extrémité de la double aiguille. Retourner le flacon de solvant au-dessus du flacon de FEIBA puis enfoncer rapidement l'aiguille dans le centre du bouchon du flacon de FEIBA. Le vide contenu dans le flacon de poudre permet d'aspirer le solvant. 6. Déconnecter les deux flacons en enlevant l'aiguille du bouchon du flacon du solvant puis du flacon de FEIBA. Agiter doucement jusqu'à dissolution complète (moins de 10 minutes). S'assurer que le FEIBA est entièrement dissous, afin d'éviter que la substance active soit retenue par l'aiguille-filtre. Le mélange préalable avec d'autres produits et (ou) médicaments est formellement déconseillé. **Administration: utiliser une technique aseptique.** Il est recommandé de commencer l'administration dans les 3 heures suivant la reconstitution. Le matériel reconstitué ne doit pas être réfrigéré. La solution est claire ou légèrement opalescente. Ne pas utiliser de solution trouble ou contenant un dépôt. 1. Adapter l'aiguille-filtre sur la seringue à usage unique et tirer le piston pour faire rentrer l'air dans la seringue. 2. Insérer l'aiguille-filtre dans le flacon de FEIBA reconstitué. 3. Injecter de l'air dans le flacon puis aspirer le matériel reconstitué dans la seringue. 4. Enlever et jeter l'aiguille-filtre. Fixer l'aiguille à usage unique ou le set d'administration à la seringue. Injecter lentement par voie intraveineuse sans dépasser 2 unités FEIBA/kg/minute. **Présentation avec BAXJECT 1.** Ouvrir l'emballage de BAXJECT en retirant l'opercule sans toucher l'intérieur (Fig. a). 2. Ne pas retirer BAXJECT de l'emballage. Retourner l'emballage vers le bas et insérer la pointe de BAXJECT de solvant dans le centre du bouchon du flacon de solvant. Saisir l'emballage par les rebords puis retirer l'emballage de BAXJECT (Fig. b). 3. Retourner le flacon de solvant connecté à BAXJECT, sur lui-même de sorte que le flacon de solvant se trouve en haut. Insérer l'autre pointe dans le centre du bouchon du flacon de poudre. Le vide va aspirer le solvant dans le flacon de poudre (Fig. c). 4. Agiter doucement jusqu'à dissolution complète. Le mélange préalable avec d'autres produits et (ou) médicaments est formellement déconseillé. **Administration: utiliser une technique aseptique.** Il est recommandé de commencer l'administration dans les 3 heures suivant la reconstitution. Le matériel reconstitué ne doit pas être réfrigéré. La solution est claire ou légèrement opalescente. Ne pas utiliser de solution trouble ou contenant un dépôt. 1. Tourner la manette de BAXJECT vers le flacon de poudre (bas) jusqu'à ce qu'on entende un déclic puis retirer le capuchon (Fig. d). 2. Aspirer de l'air dans la seringue, la connecter au dispositif BAXJECT et injecter l'air dans le flacon de poudre (Fig. e). 3. Tout en maintenant le piston de la seringue en place, retourner le système (flacon de poudre désormais en haut). Remplir la seringue de solution reconstituée en tirant doucement le piston arrière (Fig. f). 4. Remettre la manette dans sa position initiale (parallèlement à l'axe horizontal) et retirer la seringue. 5. Fixer l'aiguille à usage unique ou le set d'administration à la seringue. Injecter lentement par voie intraveineuse sans dépasser 2 unités FEIBA/kg/minute. **7. TITULAIRE DE L'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE Baxter AG, Industriestrasse 67 A - 1220 - I Vienne, Autriche. 8. NUMERO(S) D'AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE EN ALGERIE CLV n° 09/12/147/298 500 U de poudre en flacon (verre) + 20 ml de solvant en flacon (verre) munis de bouchons (chlorobutyle) avec une aiguille de transfert, une aiguille-filtre, une aiguille d'aération, une aiguille de perfusion et une seringue à usage unique (polypropylène), un nécessaire d'injection comprenant une tubulure avec une aiguille à ailette - boîte de 1. **10. DATE DE MISE A JOUR DU TEXTE :** 06/07/2007. **CONDITIONS DE PRESCRIPTION ET DE DELIVRANCE** Liste I. Médicament soumis à prescription hospitalière.**



Nos Partenaires & Sponsors



La Société Algérienne d'Hématologie et de Transfusion Sanguine



organise

VIIIème

Congrès National d'Hématologie

XXVIème Journée Nationale

**Du 27 au 29 mai 2011
SHERATON Oran**

Thèmes:

- Leucémies aiguës
- Coagulopathies congénitales (hors hémophilie)

A. CAÏN 1988