

# Recherche & quantification de clone HPN par cytométrie en flux



## HARMONISATION DES CONCLUSIONS

**Diagnostic & suivi**

**Dr Agathe DEBLIQUIS**  
Laboratoire d'Hématologie  
Groupe Hospitalier  
de la Région Mulhouse Sud Alsace

**Dr Bernard DRÉNOU**  
Service clinique et laboratoire  
d'Hématologie  
Groupe Hospitalier de la Région  
Mulhouse Sud Alsace

**Dr Magali LE GARFF-TAVERNIER**  
Service d'Hématologie biologique  
Hôpitaux universitaires  
Pitié-Salpêtrière - Charles-Foix

**Pr Marie LOOSVELD**  
Laboratoire d'Hématologie  
Hôpital Universitaire de la Timone  
Marseille

**Pr Oriane WAGNER-BALLON**  
Département d'Hématologie  
et d'Immunologie biologiques  
Hôpitaux universitaires Henri Mondor

Travail élaboré avec le Centre de Référence  
aplasies médullaires HPN :

**Pr Régis PEFFAULT DE LATOUR**  
Service d'Hématologie  
Hôpital Saint-Louis

**Dr Flore SICRE DE FONTBRUNE**  
Service d'Hématologie  
Hôpital Saint-Louis



La qualification du clone HPN dépend de sa taille :

- ≥ 50% : clone HPN majoritaire
- 1-50% : clone HPN minoritaire
- 0,1-1% : clone HPN minoritaire
- 0,01% - <0,1% : rares cellules présentant un déficit en protéines GPI-liées<sup>1,2</sup>

Une interprétation en fonction du contexte clinico-biologique doit être rendue ; seules les situations les plus fréquentes sont présentées dans ce document.

Un suivi doit être demandé selon les recommandations internationales actuelles<sup>1</sup>

Une réunion de concertation pluridisciplinaire nationale est organisée mensuellement par le centre de référence « Aplasie médullaire »

PRÉSENCE D'UN CLONE HPN

NON

OUI

Présence d'un clone HPN (majoritaire / - /minoritaire) ou de rares cellules présentant un déficit en protéines GPI-liées sur les polynucléaires neutrophiles quantifié(es) à \_\_%, confirmé(es) sur les monocytes à \_\_% et les hématies à \_\_%<sup>1</sup>

À interpréter en fonction du contexte clinico-biologique et en particulier du bilan d'hémolyse<sup>3</sup>

Hémolyse inexpliquée<sup>a</sup>

Cytopénie(s) inexpliquée(s)<sup>c</sup>

Aplasia médullaire

Thrombose inexpliquée<sup>b</sup>

Syndrome myélodysplasique

Un clone HPN (ou de rares cellules déficitaires) est (sont) détecté(es) chez environ 50% des patients présentant une aplasia médullaire<sup>4</sup>

En cas de clone HPN <1% : La pertinence clinique d'un clone HPN < 1% reste à définir<sup>1</sup>

Un suivi est recommandé au moins une fois par an ou en cas d'évolution clinico-biologique<sup>1,5</sup>

Un suivi est recommandé tous les 6 mois puis au moins une fois par an si la taille du clone est stable pendant 2 ans<sup>1,5</sup>

Ce(tte) patient(e) peut être inclus(e) dans l'Observatoire National des clones HPN

Si un traitement spécifique de l'HPN est envisagé, l'avis du Centre de Référence est fortement recommandé

# HARMONISATION DES CONCLUSIONS

ABSENCE  
DE CLONE  
HPN

Absence de clone HPN détectable à une limite de sensibilité de  $1 \times 10^{-n}$  sur les polynucléaires neutrophiles<sup>1</sup>

Limite de sensibilité de  $1 \times 10^{-4}$  atteinte ?

OUI

En cas d'aplasie médullaire suspectée ou confirmée : un clone HPN est détecté chez environ 50% des patients présentant une aplasie médullaire au diagnostic ou au cours du suivi ce qui justifie un contrôle annuel<sup>1,4,5</sup>

NON

La leucopénie n'ayant pas permis d'obtenir une sensibilité suffisante, il est souhaitable de renvoyer un échantillon en contactant au préalable le laboratoire afin de déterminer le volume de sang nécessaire

Sensibilité de la technique optimale sur les polynucléaires neutrophiles (PNN)<sup>1</sup>

## CALCULER LA LIMITE DE SENSIBILITÉ DU TEST<sup>1</sup> :

Clone minimal défini à 20 événements/nombre de PNN acquis analysables

Si limite de sensibilité de la technique :

- **ATTEINTE** ( $\geq 200\ 000$  PNN analysés) ► rendre  $1 \times 10^{-4}$
- **NON ATTEINTE** ( $< 200\ 000$  PNN analysés) ► rendre la limite de sensibilité du test calculée :  $20/\text{nombre de PNN analysés}$

- a. Hémolyse inexpliquée intravasculaire : anémie hémolytique à test de Coombs négatif et/ou hémoglobinurie
- b. Thrombose inexpliquée veineuse ou artérielle + un des critères suivants : sites inhabituels et/ou signes d'hémolyse et/ou cytopénie(s)
- c. Cytopénie(s) inexpliquée(s) + un des critères suivants : signes d'hémolyse et/ou thrombose(s)

## La qualification du clone HPN dépend de sa taille :

- ≥ 50% : clone HPN majoritaire
- 1-50% : clone HPN minoritaire
- 0,1-1% : clone HPN minoritaire
- 0,01% - <0,1% : rares cellules présentant un déficit en protéines GPI-liées<sup>1,2</sup>

Un suivi doit être demandé selon les recommandations internationales actuelles<sup>1</sup>



Persistance d'un clone HPN (majoritaire / - /minoritaire) ou de rares cellules présentant un déficit en protéines GPI-liées sur les polynucléaires neutrophiles quantifié(es) à \_\_%, confirmé(es) sur les monocytes à \_\_% et les hématies à \_\_%<sup>1</sup>

Augmentation\* / Stabilité / Diminution de la taille du clone par rapport à l'antériorité (date)

\*En cas de traitement par inhibiteur du complément, il est habituel d'observer une augmentation de la taille du clone<sup>6</sup>

À interpréter en fonction du contexte clinico-biologique et thérapeutique<sup>3</sup>

Un suivi doit être demandé selon les recommandations internationales actuelles<sup>1</sup>

Un suivi est recommandé une fois par an ou en cas d'évolution clinico-biologique<sup>1,5</sup>  
*En cas d'aplasie médullaire* : un suivi est recommandé tous les 6 mois puis au moins une fois par an si la taille du clone est stable pendant 2 ans<sup>1,5</sup>

# HARMONISATION DES CONCLUSIONS

ABSENCE  
DE  
DÉTECTION

Absence de clone HPN détectable à une limite de sensibilité de  $x10^{-n}$  sur les polynucléaires neutrophiles<sup>1</sup>

Limite de sensibilité de  $1 \times 10^{-4}$  atteinte ?

OUI

Résultat à interpréter en fonction de l'évolution du contexte clinico-biologique depuis la dernière antériorité (date)

NON

La leucopénie n'ayant pas permis d'obtenir une sensibilité suffisante, il est souhaitable de renvoyer un échantillon en contactant au préalable le laboratoire afin de déterminer le volume de sang nécessaire

Sensibilité de la technique optimale sur les polynucléaires neutrophiles (PNN)<sup>1</sup>

## CALCULER LA LIMITE DE SENSIBILITÉ DU TEST<sup>1</sup> :

Clone minimal défini à 20 événements/nombre de PNN acquis analysables

Si limite de sensibilité de la technique :

- **ATTEINTE** ( $\geq 200\ 000$  PNN analysés) ► rendre  $1 \times 10^{-4}$
- **NON ATTEINTE** ( $< 200\ 000$  PNN analysés) ► rendre la limite de sensibilité du test calculée :  $20/\text{nombre de PNN analysés}$



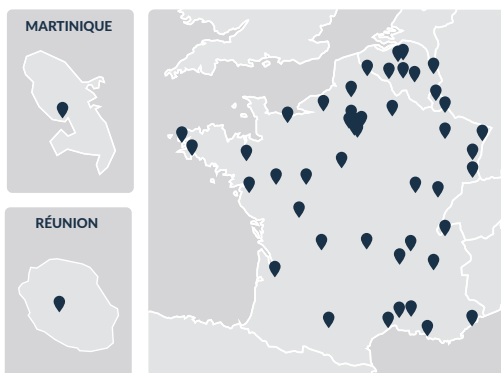
# LE GROUPE



## LES ORGANISATEURS

- › Dr Agathe DEBLIQUIS
- › Dr Bernard DRÉNOU
- › Dr Magali LE GARFF-TAVERNIER
- › Pr Marie LOOSVELD
- › Pr Oriane WAGNER-BALLON

## LES PARTICIPANTS



**LBMR**

## LABORATOIRES DE BIOLOGIE MÉDICALE DE RÉFÉRENCE pour la recherche et quantification de clone HPN

(Journal officiel, Arrêté du 15 juillet 2021)

**Laboratoire  
d'Hématologie**  
Groupe Hospitalier  
de la Région  
Mulhouse Sud Alsace

**Service  
d'Hématologie biologique**  
Hôpitaux universitaires  
Pitié-Salpêtrière -  
Charles-Foix

**Département d'Hématologie  
et d'Immunologie  
biologiques**  
Hôpitaux universitaires  
Henri Mondor

**PROGRAMME  
DE COMPARAISONS  
INTER-LABORATOIRES (CIL)<sup>7</sup>  
DEPUIS 2013**



## DEUX ENQUÊTES PAR AN :

1

### Enquête cas frais

Envoi de 2 échantillons  
sanguins

2

### Enquête cas virtuels

Téléchargement de  
2 fichiers bruts de  
cytométrie en flux

**ÉTUDE  
OBSERVATIONNELLE  
FRANÇAISE  
DEPUIS  
2016**



## CRITÈRES D'INCLUSION :

Tout patient, quel que soit  
son âge, pour lequel un  
clone HPN a été mis en  
évidence après  
le 29/02/2016

Pour toute demande de révision de cas ou de second avis,  
ou pour toute question,  
vous pouvez contacter les organisateurs du groupe CytHem-HPN  
via le formulaire de contact sur :

[www.cythem.fr/cythem-hpn-contact/](http://www.cythem.fr/cythem-hpn-contact/)

**Dans les parties « Diagnostic » et « Suivi » de cette brochure, les phrases inscrites dans les encadrés colorés sont des propositions de conclusions à mentionner dans vos comptes-rendus de laboratoire. Les phrases inscrites dans [les encadrés avec contours en pointillés] sur fond plus clair sont à mentionner selon le contexte.**

## Références :

1. Illingworth A, Marinov I, Sutherland DR, Wagner-Ballon O, DeVecchio L. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 3 - data analysis, reporting and case studies. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2018;94:49-66.
2. Bruno Fattizzo, Robin Ireland, Alan Dunlop, Deborah Yallop, Shireen Kassam, Joanna Large, Shreyans Gandhi, Petra Muus, Charles Manogaran, Katy Sanchez, Dario Consonni, Wilma Barcellini, Ghulam J. Mufti, Judith C. W. Marsh & Austin G. Kulasekararaj. Clinical and prognostic significance of small paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia. *Leukemia*, 2021, volume 35, pages3223-3231.
3. Schrezenmeier H, Muus P, Socié G, Szer J, Urbano-Ispizua A, Maciejewski JP, Brodsky RA, Bessler M, Kanakura Y, Rosse W, Khursigara G, Bedrosian C, Hillmen P. Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica* 2014;99:922-929.
4. Young NS, Scheinberg P, Calado RT. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol.* 2008 May;15(3):162-8.
5. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J-I, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Young N, Kinoshita T, Rosse W, Socié G, International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;106:3699-3709.
6. Brodsky R, Young N, Antonoli E, Risitano A, Schrezenmeier H, Schubert J, Gaya A, Coyle L, de Castro C, Fu CL, Maciejewski J, Bessler M, Kroon HD, Rother R, Hillmen P. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2008 Feb 15;111(4):1840-7.
7. Debliquis A, Wagner-Ballon O, Le Garff-Tavernier M, Fossat C, Chatelain B, Letestu R, Drénou B, HPN-AFC Group. Evaluation of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria screening by flow cytometry through multicentric interlaboratory comparison in four countries. *Am. J. Clin. Pathol.* 2015;144:858-868.