



LIENS D'INTÉRÊT



- Advisory boards pour Alexion Pharmaceuticals France et conférences Alexion Pharmaceuticals France et Espagne, Novartis
- Financement recherche Alexion Pharmaceuticals France, Novartis et Sobi



- Advisory boards pour Alexion Pharmaceuticals France et conférences Alexion Pharmaceuticals France
- Conférences pour Novartis

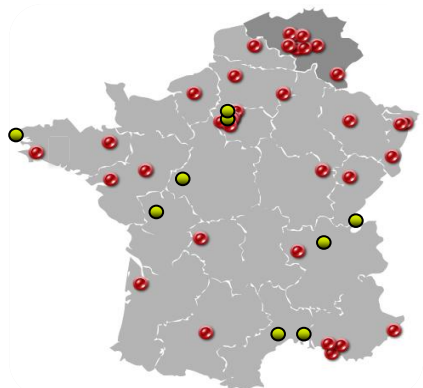
RECHERCHE DE CLONES HPN EN FRANCE DEPUIS 2010

2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026

Workshop du
groupe
français HPN^{AFC}

HPN^{AFC}

Comparaisons
interlaboratoires
Frais & Virtuel



www.cythem.fr

OBSERVATOIRE NATIONAL DES CLONES HPN



2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026

**OBSERVATOIRE NATIONAL
DES CLONES HPN**

**Tous les clones HPN $\geq 0,01\%$
nouvellement ou précédemment
diagnostiqués**



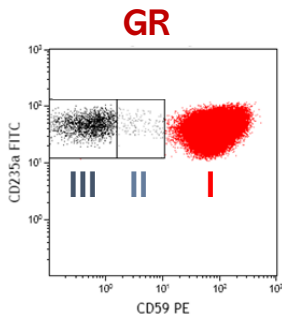
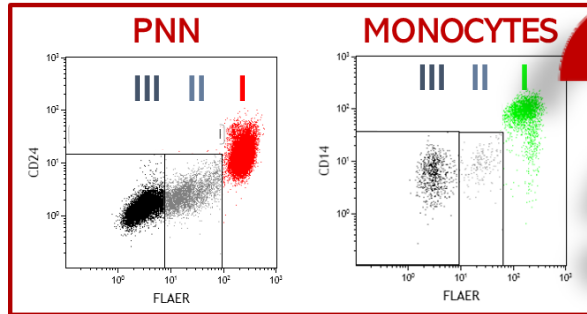
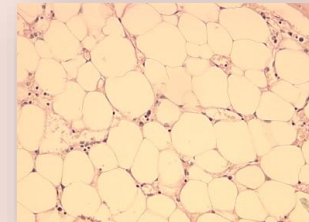
SIGNIFICATION DES CELLULES HPN DE TYPE II



ANÉMIE HÉMOLYTIQUE ACQUISE



APLASIE MÉDULLAIRE

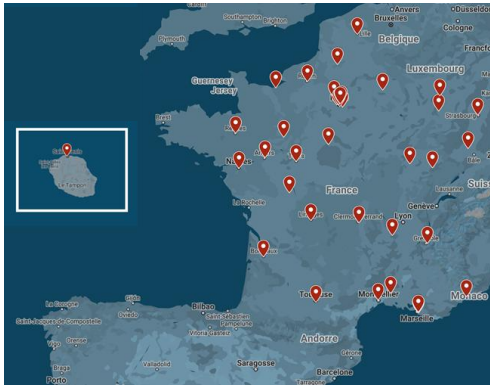


THROMBOSES INEXPLIQUÉES

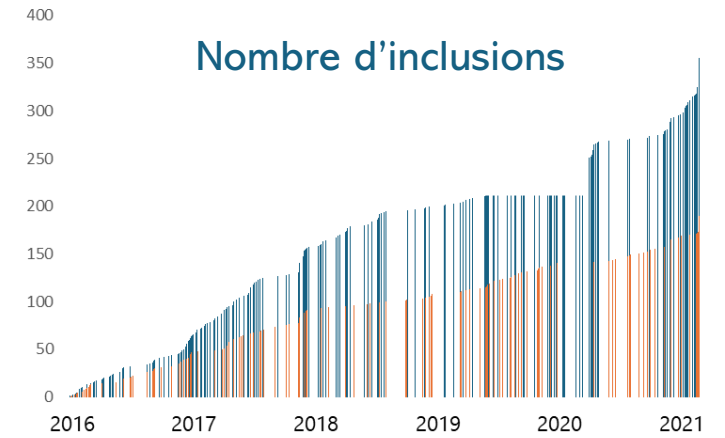


Griffin, Haematologica 2019
Richards, BJH 2020
Gurnari, Blood 2024

Peffault de Latour, Blood 2008
Parker, Blood 2005
Hillmen, NEJM 1995



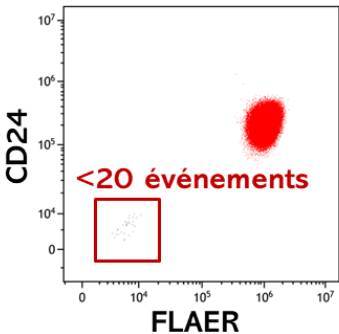
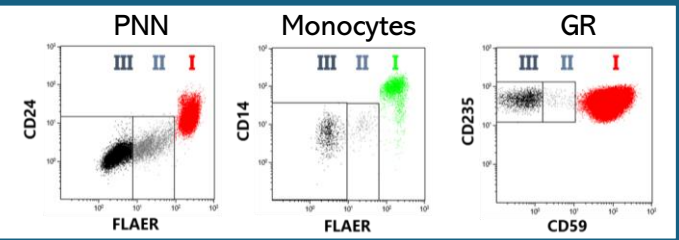
33 centres français participants



637 patients enregistrés avec un clone HPN ou des cellules déficitaires en protéines GPI-ancrées $\geq 0,01\%$ nouvellement ou précédemment diagnostiqués

Double vérification systématique par les deux investigatrices

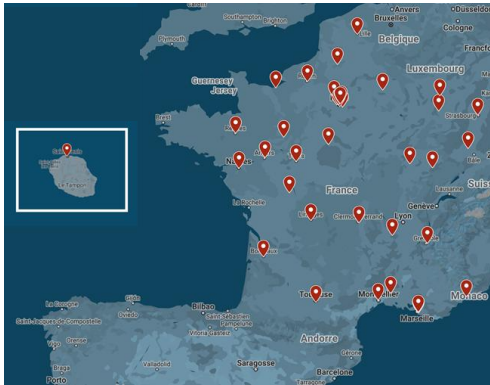
- Données brutes de cytométrie en flux
- Données biologiques et cliniques



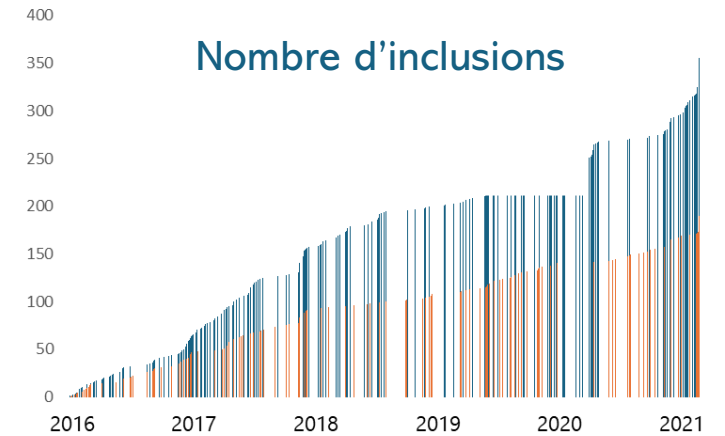
23 patients « faux positifs »

23 patients « pré-Observatoire »

46 patients « post-Observatoire »



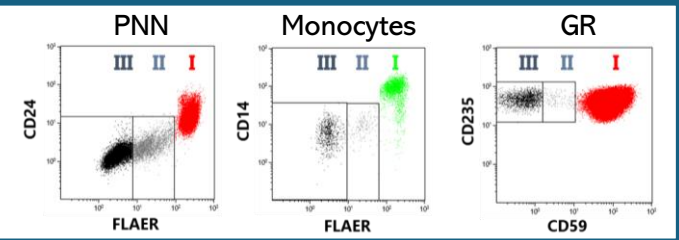
33 centres français participants



637 patients enregistrés avec un clone HPN ou des cellules déficitaires en protéines GPI-ancrées $\geq 0,01\%$ nouvellement ou précédemment diagnostiqués

Double vérification systématique par les deux investigatrices

- Données brutes de cytométrie en flux
- Données biologiques et cliniques

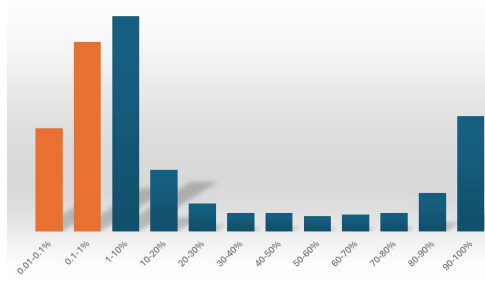


23 patients « faux positifs »

23 patients « pré-Observatoire »

46 patients « post-Observatoire »

545 patients inclus avec un clone HPN ou cellules déficitaires protéines GPI-ancrées $\geq 0,01\%$



**545 patients
inclus avec un
clone HPN $\geq 1\%$**

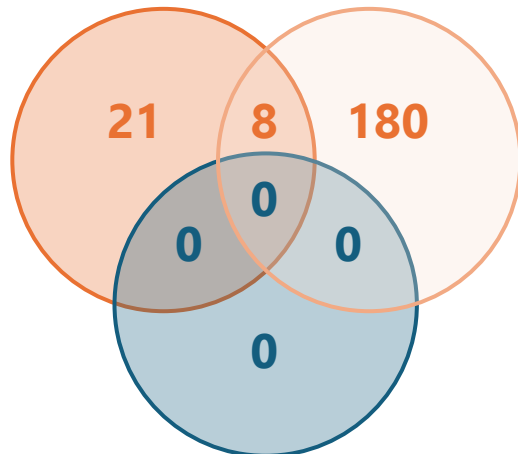
355 patients avec clone HPN $\geq 1\%$

222 patients avec clone HPN 1-50%

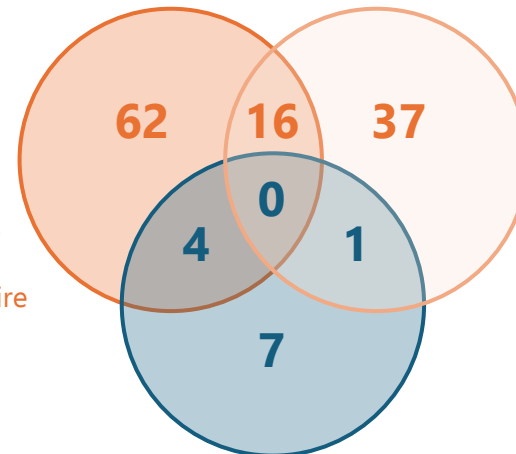
133 patients avec clone HPN $\geq 50\%$

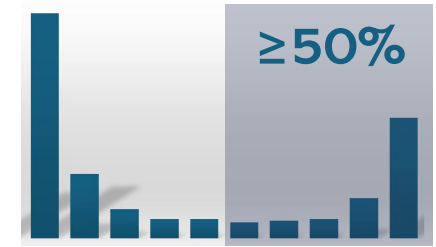
**209 patients avec données
cliniques disponibles**

**127 patients avec données
cliniques disponibles**



- Anémie hémolytique
- Insuffisance médullaire
- Thrombose





133 patients

6 patients ← NON

PNN de type II évaluable ?

OUI

127 patients avec PNN de type II évaluable

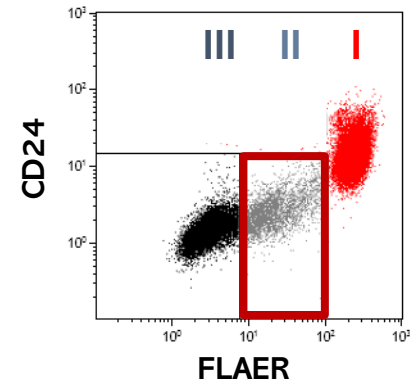
Calcul du pourcentage relatif (%rel) de PNN type II = $\text{type II} / (\text{II} + \text{III}) \times 100$

20 patients ← NON

Statut d'hémolyse disponible ?

OUI

107 patients



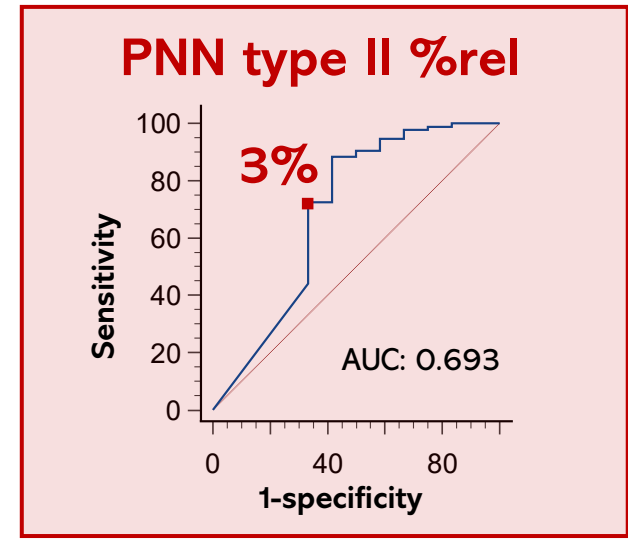
HÉMOLYSE

OUI

95 patients

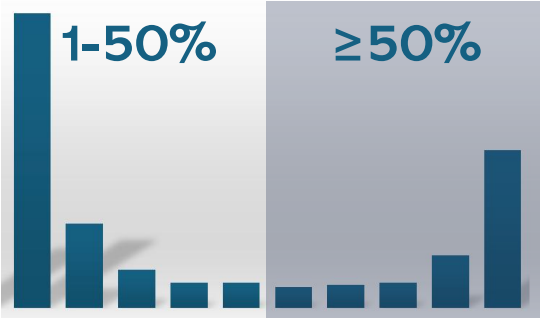
NON

12 patients

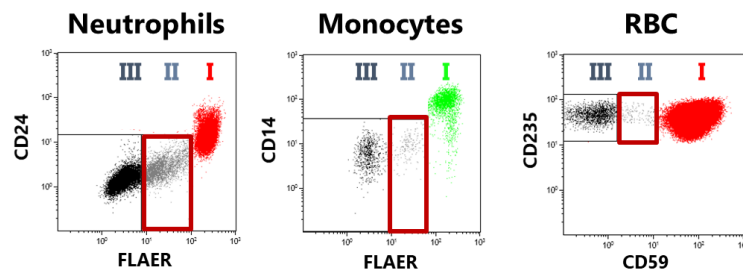




355 patients avec un clone PNH $\geq 1\%$



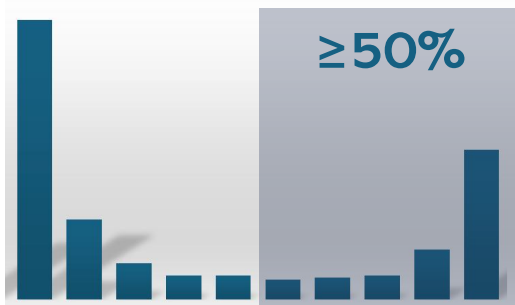
133 patients avec un clone PNH $\geq 50\%$



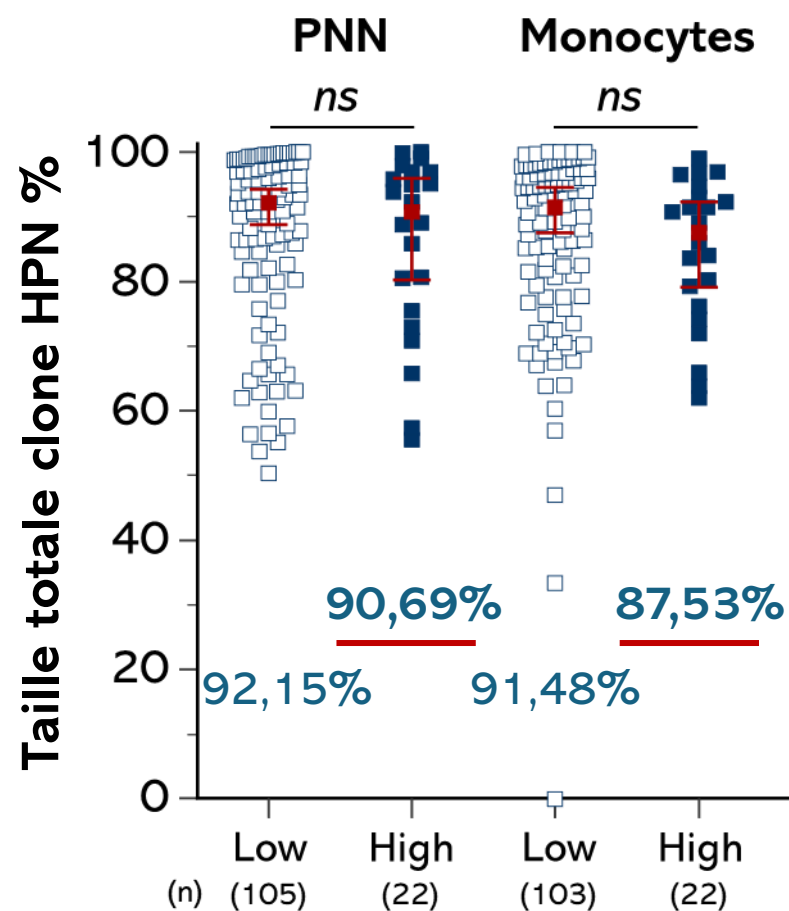
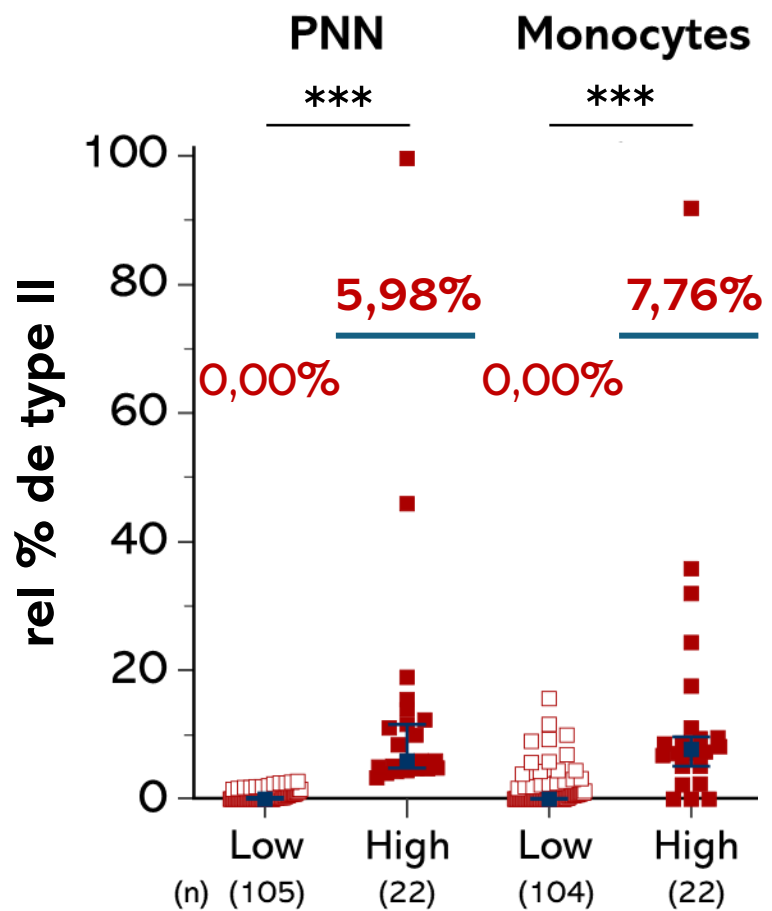
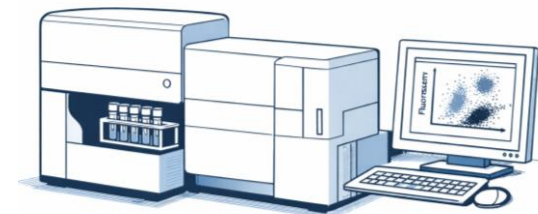
127 avec %rel de PNN type II

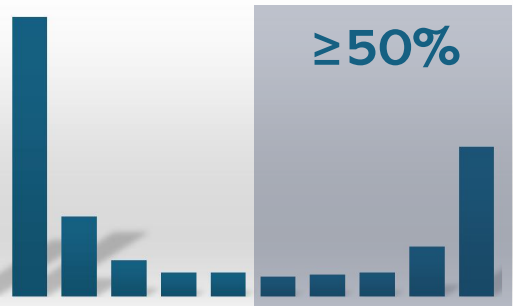
**105 patients avec %rel $< 3\%$
"Low type II"**

**22 patients avec %rel $\geq 3\%$
"High type II"**

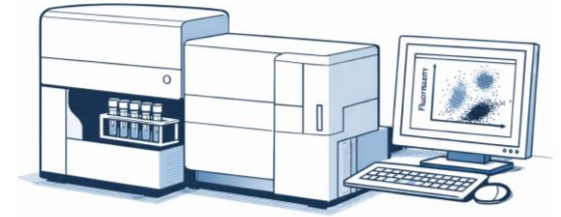


HIGH TYPE II VS LOW TYPE PATIENTS



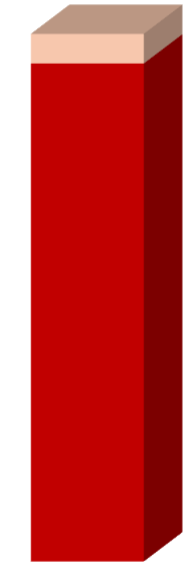


HIGH TYPE II VS LOW TYPE PATIENTS



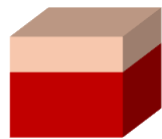
HÉMOLYSE

84/89

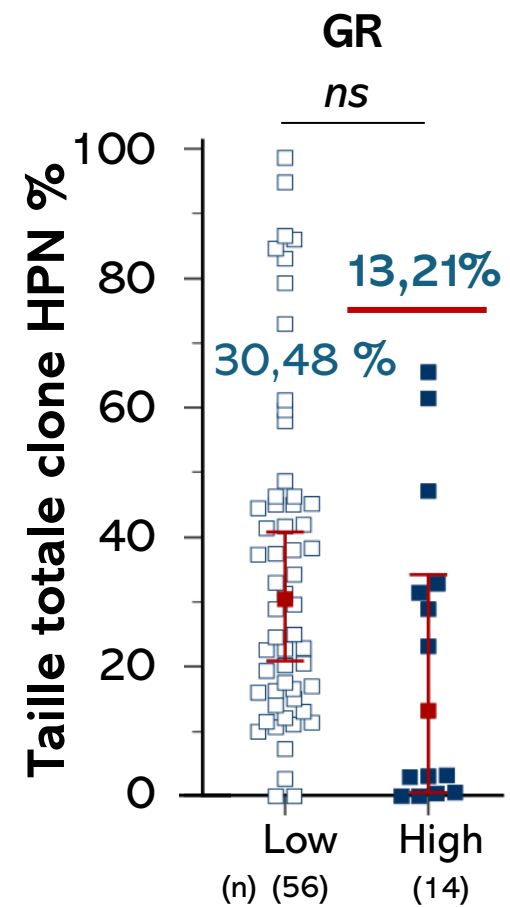
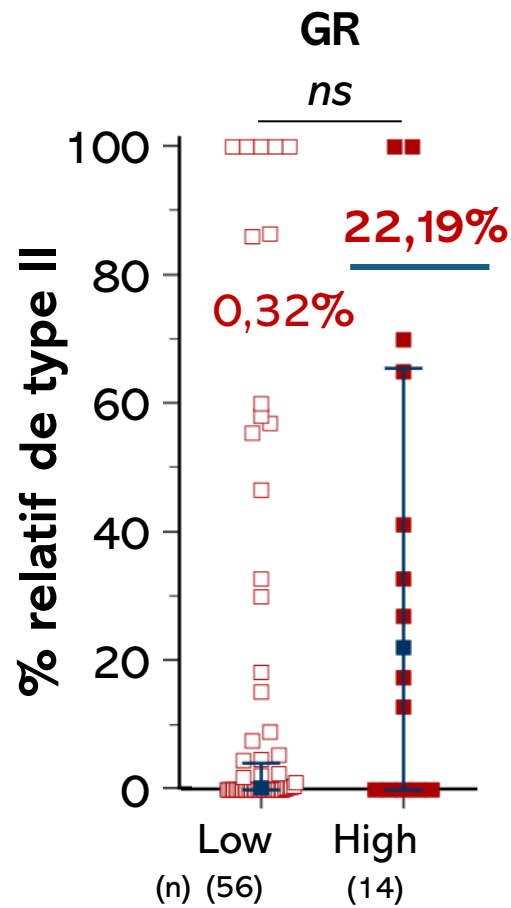


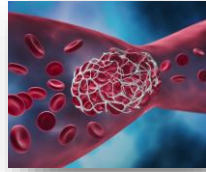
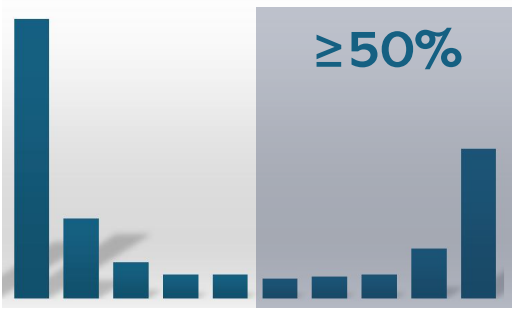
Low type II

11/17

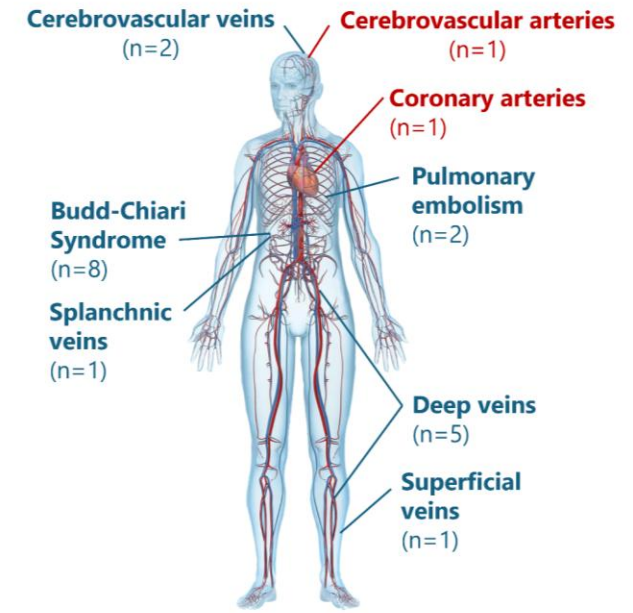


High type II



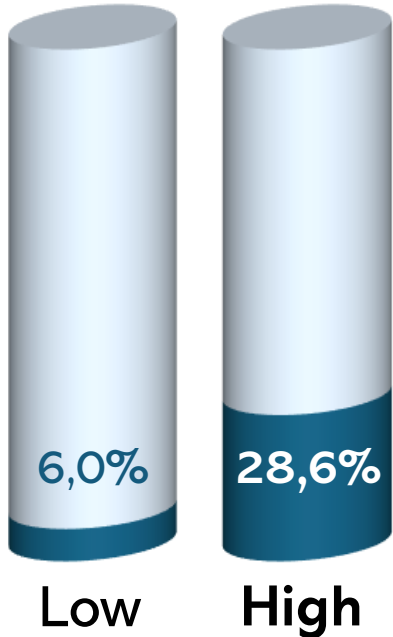


THROMBOSES



AU DIAGNOSIS

$p=0,006$

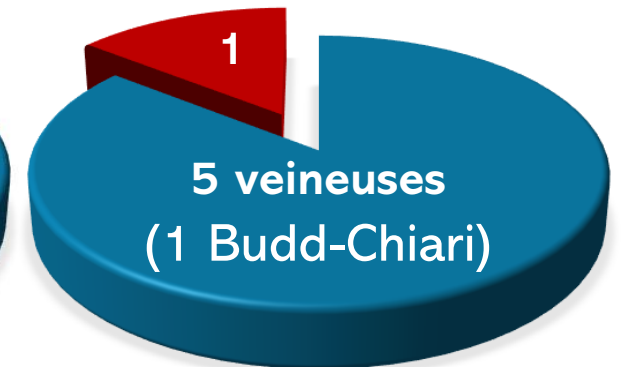


Low type II

*Aucun traitement

Clone HPN total

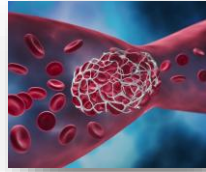
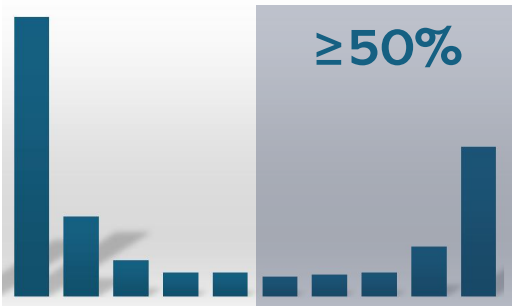
[87,01%-100%]



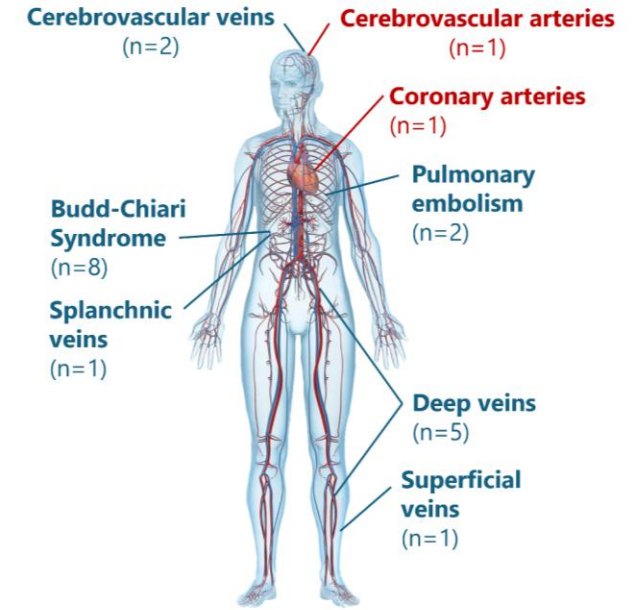
High type II

*Aucun traitement

[65,82%-89,13%]

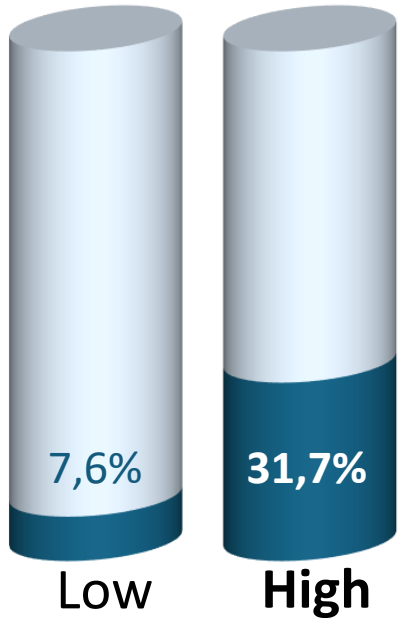


THROMBOSES



+ SUIVI

$p=0,0048$



Low type II



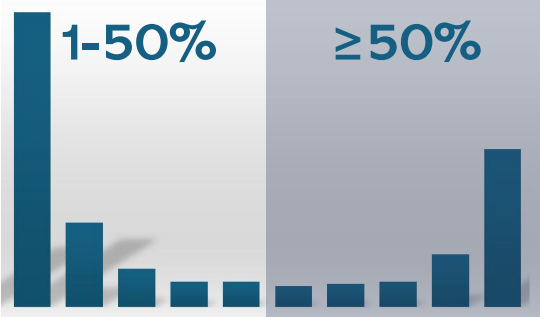
High type II

Clone HPN total

Diagnostic	62,90%	79,89%	99,94%
	↓ _{0,9a}	↓ _{2,2a}	↓ _{2a}
Thrombose	79,85%	91,66%	100,00%

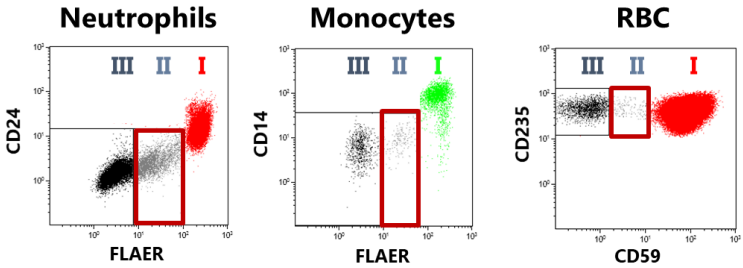


355 patients avec un clone PNH $\geq 1\%$



133 patients avec un clone PNH $\geq 50\%$

222 patients avec un clone PNH 1-50%



127 avec %rel de PNN type II

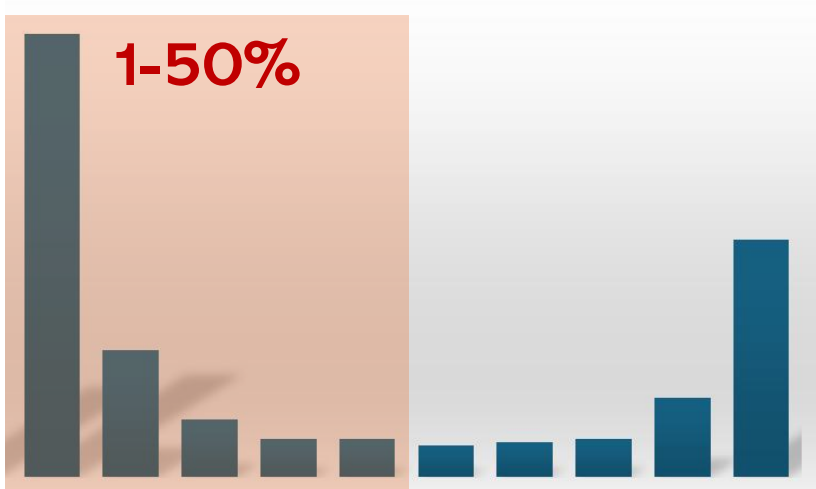
207 avec %rel de PNN type II

**105 patients avec %rel <3%
"Low type II"**

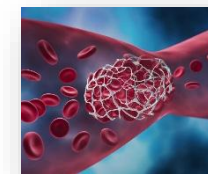
**22 patients avec %rel $\geq 3\%$
"High type II"**

**120 patients avec %rel <3%
"Low type II"**

**87 patients avec %rel $\geq 3\%$
"High type II"**



222 patients avec PNH clone [1-50%]



207 avec PNN
de type II évaluable



36/120



Low

13/87



High

AU DIAGNOSIS

0/120

0%

Low

0/87

0%

High

+ SUIVI

0/120

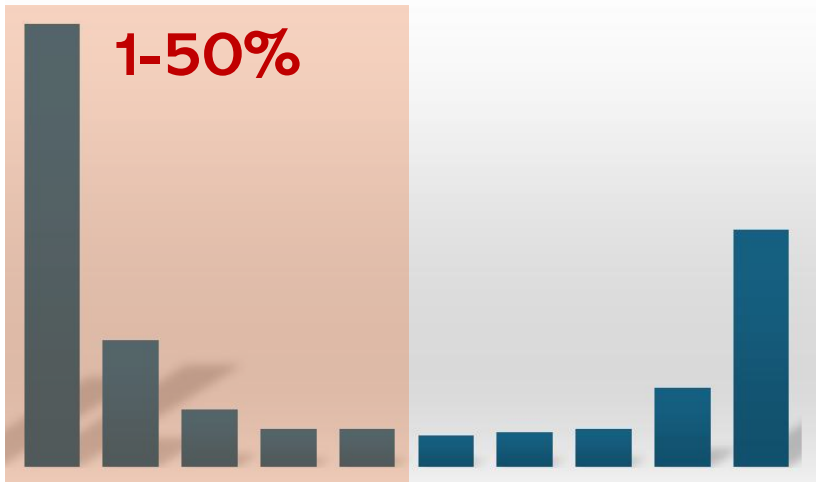
0%

Low

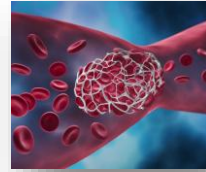
2/87

2,3%

High



222 patients avec PNH clone [1-50%]



THROMBOSES



207 avec PNH
de type II évaluable



Low type II



2 veineuses
(1 Budd-Chiari)

High type II

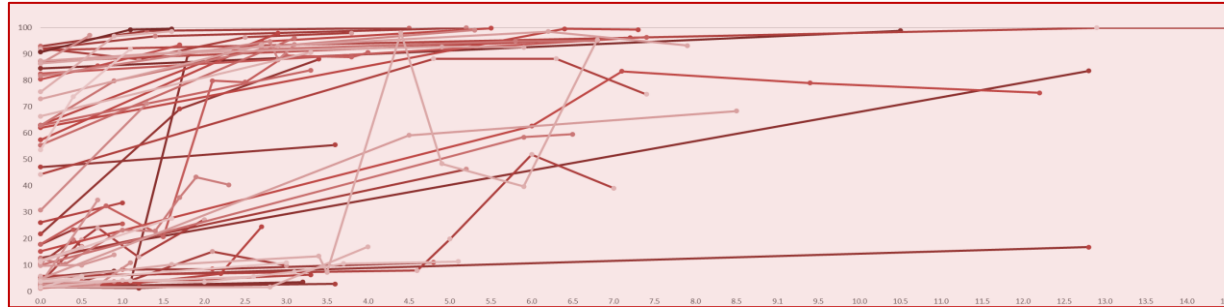
Total PNH clone size

Diagnostic	4,74%	21,77%
	↓4,5a	↓3,4a
Thrombose	59,20%	88,06%



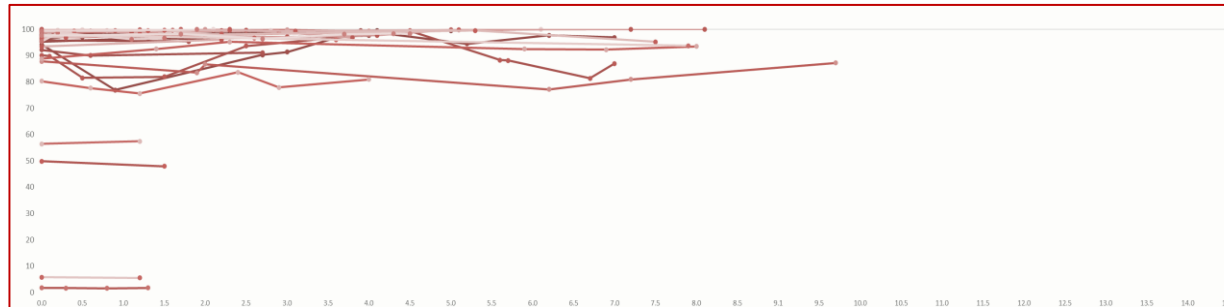
Evolution de la taille totale du clone HPN sur PNN (%)

↗
+14,3%



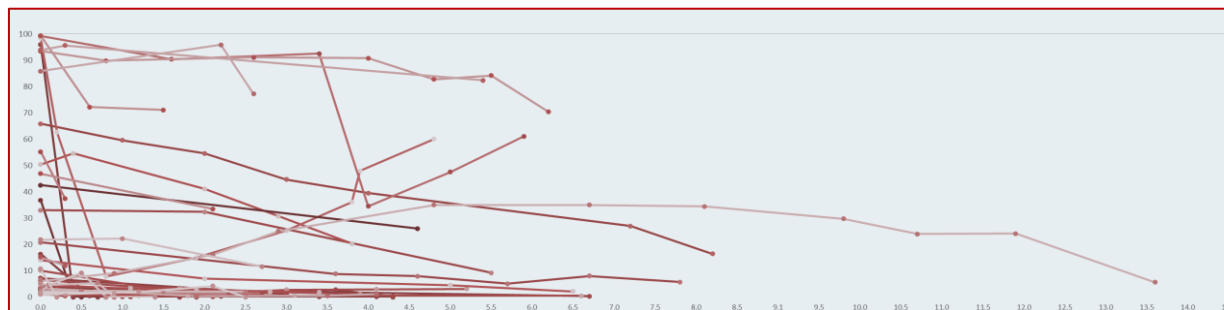
61 patients
(52% *traités*)

=
+0,0%



35 patients
(83% *traités*)

↘
-5,7%

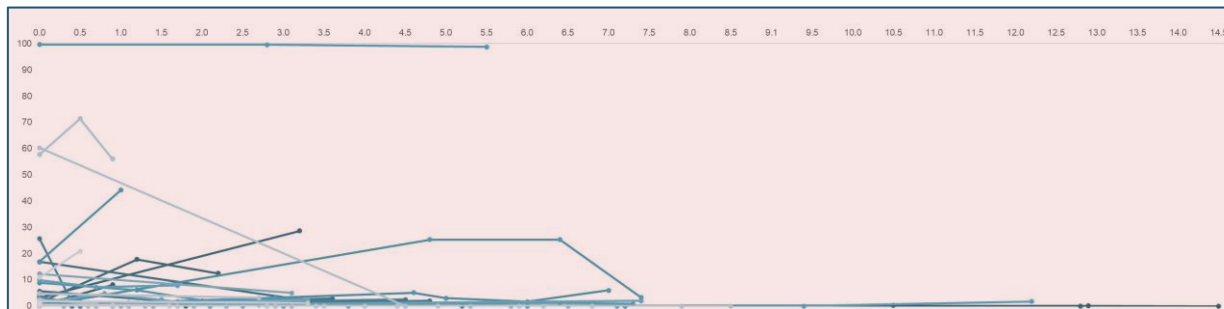


42 patients
(19% *traités*)



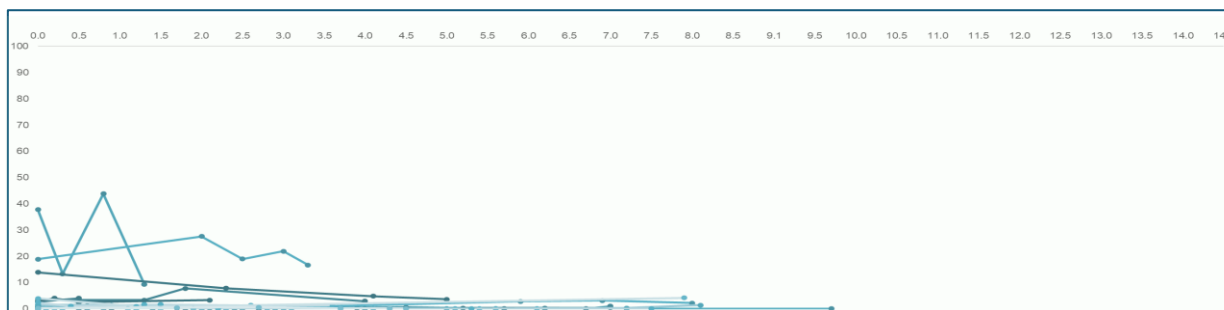
Stabilité du rel% de PNN de type II

==
+0,0%



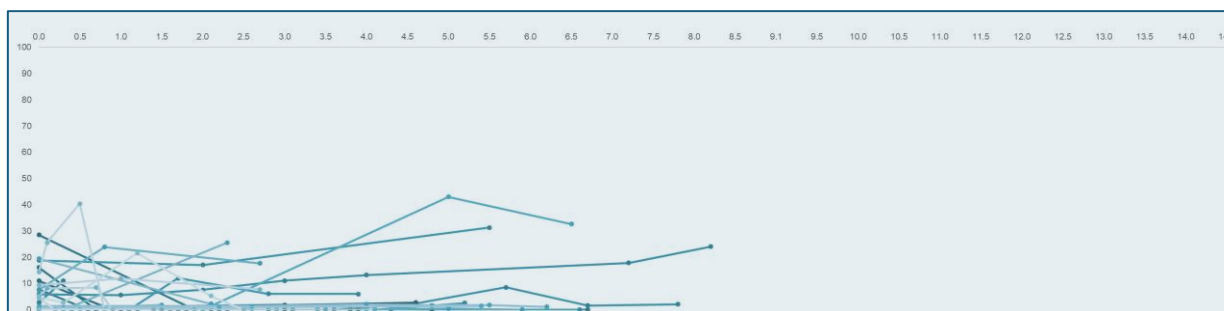
61 patients
(52% traités)

==
+0,0%



35 patients
(83% traités)

==
+0,0%



42 patients
(19% traités)

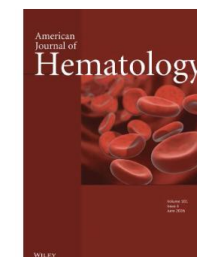
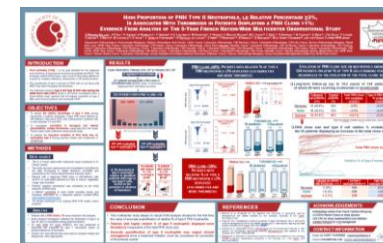
CONCLUSION



2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026

- Intérêt de quantifier précisément les cellules HPN de type II sur les PNN chez les patients présentant un clone HPN démontré pour la 1ère fois
- Les patients avec un % relatif de PNN de type II $\geq 3\%$ présentent moins d'hémolyse et plus de thromboses que que soit la taille totale du clone HPN
- Intérêt d'un suivi plus rapproché pour ces patients
- Initiation d'un traitement pour prévention des thromboses ?

EHA2025



High proportion of PNH type II neutrophils is associated with thrombosis in patients displaying a PNH clone $\geq 1\%$

Manuscript ID: 422118 Article type: Research Article Publication: American Journal of Hematology

This submission is under consideration and cannot be edited. Further information will be emailed to you by the journal editorial office.

Submitted: 20 May 2024 by Oriana Wagner-Ballon

Started: 4 April 2024 by Oriana Wagner-Ballon

Submission Overview



OBSERVATOIRE NATIONAL DES CLONES HPN



Agathe DEBLIQUIS
Bernard DRENOU



CNR

Gérard SOCIÉ
Flore SICRE DE FONTEBRUNE
Régis PEFFAULT DE LATOUR



**Webmaster
Observatoire**

**Webmaster
site CytHem**

**CRO
Cenbiotech**



Promoteur



CHU Amiens, CHU Angers, CHU Besançon, CHU Bordeaux, Hôpital Ambroise Paré Boulogne, CHU Clermont-Ferrand, CHU Henri Mondor Créteil, CHU Dijon, CHU Grenoble, CHU La Réunion, Centre CHRU Lille, CHU La Conception Marseille, Institut Paoli Calmette Marseille, CHU Timone Marseille, CHU Montpellier, GHRMSA Mulhouse, CHRU Nancy, CHU Nantes, CHU Nîmes, Hôpital Cochin Paris, Hôpital Lariboisière Paris, Hôpital Necker Paris, CHU Pitié-Salpêtrière Paris, Hôpital St-Louis Paris, CHU Poitiers, CHU Reims, CHU Pontchaillou Rennes, CHU Charles Nicolle Rouen, CHU St-Etienne,, CHU Strasbourg, CHU Toulouse, CHRU Tours, CHU Montpellier



LIENS D'INTÉRÊT

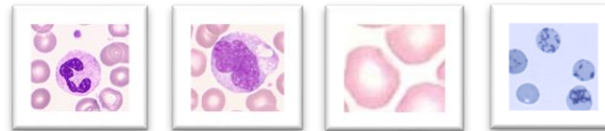


- Advisory boards pour Alexion Pharmaceuticals France, et Novartis
- Conférences pour Alexion Pharmaceuticals France, Beckman Coulter, Novartis et Sobi



- Absence de liens d'intérêts

Diagnostic et suivi des clones HPN : des blancs aux rouges !



Dr Agathe Debliquis

Laboratoire d'Hématologie
Groupe Hospitalier de la Région
Mulhouse Sud Alsace
debliquisa@ghrmsa.fr



Dr Magali Le Garff-Tavernier

Service d'Hématologie Biologique
Hôpital Universitaire Pitié-Salpêtrière
magali.legarff@aphp.fr



Pr Oriane Wagner-Ballon

Département d'Hématologie et Immunologie biologiques
Hôpitaux Universitaires Henri Mondor
orienne.wagnerballon@aphp.fr



FACULTÉ
DE SANTÉ



Du blanc aux rouges...

- Premiers tests basés sur la sensibilité des hématies à l'action lytique du complément (Sucrose, Ham-Dacie)
- Détection de clone HPN par cytométrie en flux :
Utilisation du CD55 et du CD59
- Découverte du FLAER et workshop sur les leucocytes en 2010
- Plaquelette d'harmonisation des conclusions accès principalement sur les leucocytes
- Analyse des hématies non réalisées dans de nombreux centres : Observatoire national des clones HPN et CIL (47% des centres, n= 27)
- Workshop HPN hématies en janvier 2025:
Présentations disponibles sur le site en accès privé

Hsi ED. Evaluation of the REDQUANT and CELLQUANT kits. Am J Clin Pathol 2000



Nouvelle brochure dédiée à l'analyse des hématies

Recherche et quantification de clone HPN par cytométrie en flux SUR LES HÉMATIES



Intérêt, protocole technique, stratégie d'analyse et interprétation des résultats

Document rédigé par :

Dr Agathe Debliquis

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 - APHP

Pr Oriane Wagner-Ballon

Département d'Hématologie et Immunologie biologiques
Hôpitaux universitaires Henri-Mondor - APHP

Organisatrices du groupe CytHem-HPN
et membres de l'association



Association de Cytométrie
Hématologique francophone
Groupe de travail sur l'Hémoglobinurie
Paroxysmique nocturne (HPN)

NOVARTIS Reimagining medicine, together.

Pour toute information supplémentaire sur la recherche et la quantification de clone HPN, vous pouvez consulter le site : www.cythem.fr

LBMR

Laboratoires de biologie médicale de référence pour la recherche et la quantification de clone HPN

(Journal officiel, Arrêté du 15 juillet 2021, Arrêté du 18 janvier 2022)

Laboratoire d'Hématologie Groupe Hospitalier de la Région Mulhouse Sud Alsace	Service d'Hématologie biologique Hôpitaux universitaires Pitié-Salpêtrière - Charles-Foix - APHP	Département d'Hématologie et Immunologie biologiques Hôpitaux universitaires Henri-Mondor - APHP
--	---	---

Références :

1. Ilingworth A, Marinov I, Sutherland DR, Wagner-Ballon O, Del Vecchio 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(1):49-66.
2. Höchsmann B, Schrezenmeier H. Congenital CD59 deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015;29(3):495-507.
3. 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(6):858-868.
4. Wagner-Ballon O, Le Garff-Tavernier M, Letestu R, Drénou B, Debliquis A. PNH French Working Group "CytHem-HPN". The PNH French Working Group experience: building a strong network of cytometrists. *Int J Lab Hematol*. 2025;47:e1-e5.
5. Packman CH, Rosenfeld SL, Jenkins DE, Thiem PA, Leddy JP. Complement lysis of human erythrocytes: differing susceptibility of two types of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to C5b-9. *J Clin Invest*. 1979;64(2):428-433.
6. Richards SJ, Dickinson AJ, Cullen MJ, et al. Clinical, haematological, and immunophenotypic features of 1081 patients with GPI-deficient (paroxysmal nocturnal haemoglobinuria) cells detected by flow cytometry. *Br J Haematol*. 2020;189(5):954-966.
7. Gurnari C, Awada H, Pagliuca S, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-related thrombosis in the era of novel therapies: a 2043 patient-year analysis. *Blood*. 2024;144(2):145-155.
8. Griffin M, Hillmen P, Munir T, Richards S, Arnold L, Riley K, Hill A. Significant hemolysis is not required for thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2019;104(3):e94-e96.
9. Tombul Z, Bahaj W, Ozturk M, et al. Ahemolytic PNH (white cell PNH): clinical features and implications of a distinct phenotype of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2024;204(5):2121-2124.
10. Risitano AM, Peffault de Latour R. How we (I) treat paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diving into the future. *Br J Haematol*. 2022;196(2):288-303.
11. Oldaker T, Whitby L, Saber M, Holden J, Wallace PK, Litwin V. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders. Part 4: assay validation and quality assurance. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(1):67-81.
12. Sutherland DR, Ilingworth A, Marinov I, et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders. Part 2: reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(1):23-48.
13. Sutherland DR, Richards SJ, Ortiz F, Nayyar R, Benko M, Marinov I, Ilingworth A. CD71 improves delineation of PNH type III, PNH type II, and normal immature red blood cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020;98(2):179-192.
14. Marinov I, Richards SJ, Pešek A, Ilingworth AJ, Sutherland DR. Validation of a single-tube 3-colour immature red blood cell screening assay for the detection and enumeration of small, medium and large paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Int J Lab Hematol*. 2022;44(5):868-874.
15. Risitano AM, Frieri C, Urciuoli E, Marano L. The complement alternative pathway in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: From a pathogenic mechanism to a therapeutic target. *Immunol Rev*. 2023;313(1):262-278.

Le cytomètre en flux BD FACSLyric™, utilisé avec les applications BD FACSuite™ Clinical et BD FACSuite™, est un dispositif médical de diagnostic *in vitro* conforme à la réglementation en vigueur et portant le marquage CE. Ces dispositifs sont certifiés CE par BSI Group The Netherlands B.V. (Organisme notifié n° 2797) Le BD FACSLyric™ est classé comme produit laser de classe 1, conformément aux normes applicables. © 2026 BD. Tous droits réservés. Sauf indication contraire, BD, le logo BD et l'ensemble des autres marques commerciales mentionnées sont la propriété de Becton, Dickinson and Company ou de ses filiales.

Le cytomètre en flux DxFLEx® et le logiciel d'analyse Kaluza® sont des marques commerciales ou des marques déposées de Beckman Coulter, Inc.

NOVARTIS Reimagining medicine, together.

FA-18/04460 - Airt 2026 - © Novartis Pharma SAS

Remerciements



Intérêts de l'analyse des hématies

Recommandations internationales 2018 : Recherche SYSTEMATIQUE du clone HPN sur les hématies, à réaliser au diagnostic et lors du suivi¹.



Définition d'un clone HPN

Détection d'au minimum 20 événements de type III (déficit total en protéines GPI-ancrées) sur au moins 2 lignées cellulaires parmi les polynucléaires neutrophiles (PNNs), les monocytes et/ou les **hématies** par cytométrie en flux (seule méthode recommandée).

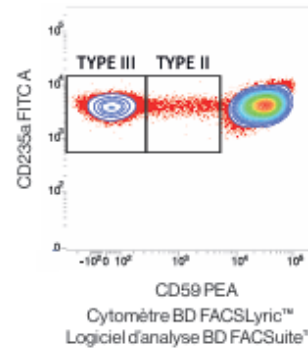
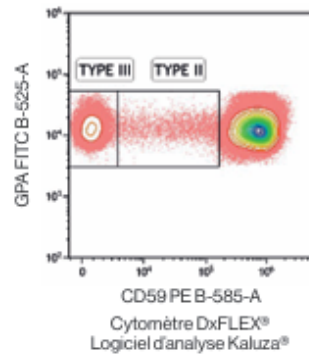


Lien avec la physiopathologie

Identification de populations avec différents types de déficit en protéines GPI-ancrées :

Hématies type III = déficit complet ; durée de vie : 10-15 jours (versus 120 jours)

Hématies type II = déficit partiel ; durée de vie : intermédiaire



Diagnostic différentiel possible de déficit congénital en CD59 : maladie génétique rare, généralement autosomique récessive, due à des mutations du gène CD59²



Intérêt biologique

- Accessibilité des hématies : 200 000 hématies facilement analysables pour obtenir la sensibilité recommandée de 1×10^{-4}
- Apport diagnostique pour confirmer la présence d'un clone HPN^{3,4} :
 - Lorsque la sensibilité est insuffisante sur les PNNs : neutropénie en cas d'insuffisance médullaire par exemple
 - Lorsque la sensibilité est insuffisante sur les monocytes



L'analyse des hématies ne doit jamais être effectuée isolément, elle doit toujours être réalisée en complément de l'analyse des leucocytes.

Tous les graphiques présentés sont des documents issus des Laboratoires de biologie médicale de référence (LBMR).



Intérêt clinique

- **Quantification des hématies de type III**, les plus sensibles à l'hémolyse⁵
- **Quantification des hématies de type II**, potentiellement associées aux thromboses^{6,7}
- **Identification de la nouvelle entité « HPN non hémolytique » ou « White cell PNH »^{8,9}** :
 - Absence d'hémolyse
 - Dissociation entre la taille du clone HPN total sur les leucocytes (PNNs et/ou monocytes) et sur les hématies
 - 2 critères de définition :
 - Critères Leeds⁸ : clone HPN leucocytes > 30 % et clone HPN hématies < 10 %
 - Critères Dallas⁹ : clone HPN leucocytes > 50 % et clone HPN hématies < 5 %



Intérêt pour le suivi

- Les recommandations internationales actuelles¹ préconisent de réaliser un suivi de la **taille du clone HPN** :
 - Au moins une fois par an ou en cas d'évolution clinique chez les patients présentant une HPN classique (crise hémolytique, thromboses...)
 - Tous les 6 mois chez les patients présentant une aplasie médullaire puis avec une fréquence moindre si le clone reste stable pendant 2 ans (une fois/an)
- Pour chaque quantification de clone HPN au diagnostic et lors de chaque suivi, il est recommandé **d'évaluer également la taille du clone sur les hématies**.
- **Evaluation de la réponse au traitement**¹⁰
 - L'augmentation de la taille du clone HPN sur les hématies sous traitement par inhibiteur du complément peut refléter une efficacité du traitement (diminution de l'hémolyse).
 - Une diminution peut être observée dans différents contextes : hémolyse, transfusions, insuffisance médullaire. Cette diminution est également observée chez des patients très bons répondeurs.



Intérêt pour la recherche

Maladie rare, existence de registres ou d'études.

Protocole technique



Echantillon sanguin

- Tube EDTA (le même que celui utilisé pour l'analyse des leucocytes)
- Analyse sur cellules fraîches < 48h, conservation à 4°C après 24 heures¹¹



Anticorps recommandés

- Importance de titrer les anticorps
→ éviter l'agrégation des hématies
(chaque laboratoire est responsable de la titration des anticorps utilisés)
- Possibilité de réaliser un cocktail d'anticorps : permet d'éviter les faibles volumes d'anticorps et les artéfacts de marquage¹²

Anticorps	Objectif	Clone
CD235a-FITC	Fenêtrage des hématies	KC16
		JC159
		10F7MN
		YTH 891
CD59-PE	Marqueur GPI-ancré	MEM-43
		OV9A2



Mode opératoire¹²

Faire une dilution au 1/100 de sang (EDTA) avec du PBS 1X

Pipetage inverse de 100 µl (sans bulles)

Ajouter les anticorps


Vortexer doucement, essayer les gouttes sur la paroi du tube  éviter l'absence de marquage d'une partie des cellules

Incuber 20 min à température ambiante et à l'obscurité

Laver 2 fois (ajouter 2 ml de PBS puis centrifuger 5 min à 400G)

Enlever le surnageant et resuspendre dans 500 µl de PBS

Racker vigoureusement  limiter les doublets

Acquérir sans attendre au moins 200 000 hématies  éviter la perte de fluorescence du CD235a (clone KC16)

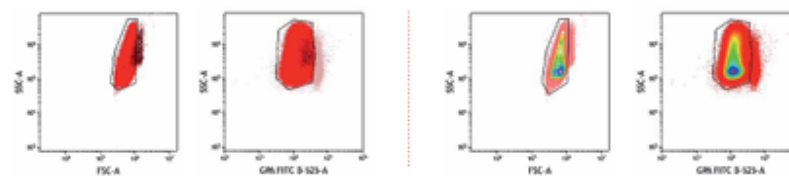


Réglages du cytomètre¹²

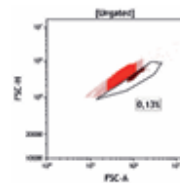
- Intérêt d'enregistrer le paramètre « TIME » → repérer un problème lors de l'acquisition (exclusion d'artéfacts comme les bulles d'air, perte de fluorescence)
- Réglage des paramètres taille/structure recommandé en échelle logarithmique
- Réglage des seuils pour limiter les débris
- Réglage de la vitesse d'acquisition pour limiter les doublets et les rejets électroniques
- Aide pour le réglage : réalisation d'un marquage sur sujet sain avec CD235a-FITC seul pour définir la zone des hématies de type III et d'un marquage CD235a-FITC/CD59-PE pour définir la zone des hématies de type I

Stratégie d'analyse

Sélection des hématies sur les paramètres morphologiques (échelle logarithmique) et l'expression du CD235a



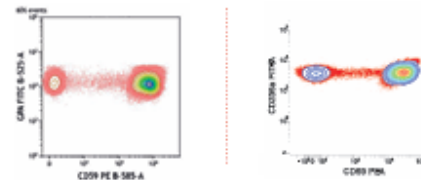
Sélection des singulets → vérifier le % de doublets



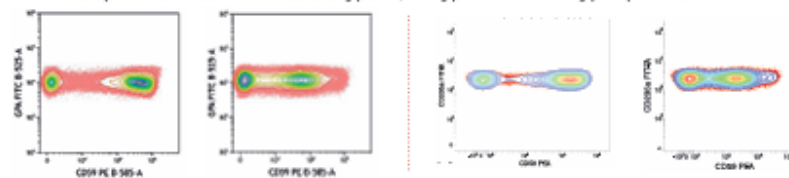
Si doublets > 2% : arrêter l'acquisition et racker à nouveau

Repérage des populations HPN (échelle biexponentielle/mode logicle)

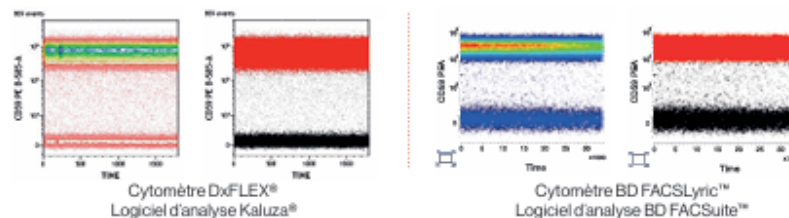
Définition d'un clone HPN : au moins 20 événements de type III



→ Séparation des hématies de type III, de type II et/ou de type I parfois difficile



Vérification sur le paramètre « TIME »



Tous les graphiques présentés sont des documents issus des Laboratoires de biologie médicale de référence (LBMR).

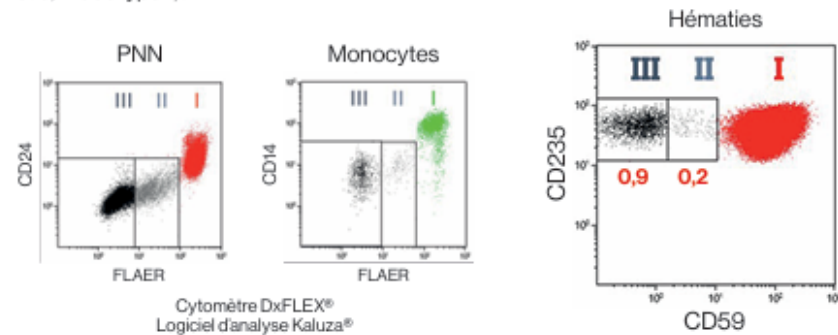
Interprétation des résultats

L'analyse des hématies est toujours réalisée en complément de celle des leucocytes → son interprétation n'est donc jamais rendue isolément

Présence d'un clone HPN (diagnostic ou suivi)

Conclusion harmonisée :

« Présence/persistance d'un clone HPN sur les polynucléaires neutrophiles quantifié à%, confirmé sur les monocytes à% et sur les hématies à 1,1% (dont 0,9% de type III et 0,2% de type II). »



Attention : si distinction des hématies de type III et de type II impossible : indiquer dans la conclusion uniquement le % du clone HPN total!

Absence de clone HPN

L'analyse des hématies étant toujours réalisée en complément de celle des leucocytes → la conclusion ne rend compte que de l'absence de clone HPN sur les PNNs.

Conclusion harmonisée :

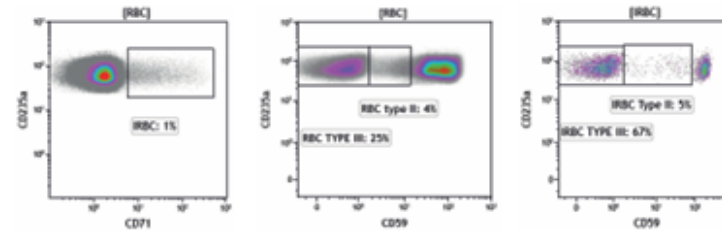
« Absence de clone détectable avec une limite de sensibilité de 10^{-4} sur les polynucléaires neutrophiles. »

Perspectives

Intérêt de l'analyse de la taille du clone HPN sur les hématies immatures (Immature Red Blood Cells ou iRBCs)^{13,14}

Ajout de l'anticorps anti-CD71 pour détecter les iRBCs

- Reflet plus pertinent de la taille du clone HPN : la taille du clone HPN des iRBCs total (type III + II) serait plus proche de celle du clone des leucocytes (PNNs et monocytes).
- Amélioration de la quantification des cellules GPI déficitaires : permettrait une distinction plus nette entre les populations HPN type III, type II et les type I sur les iRBCs.



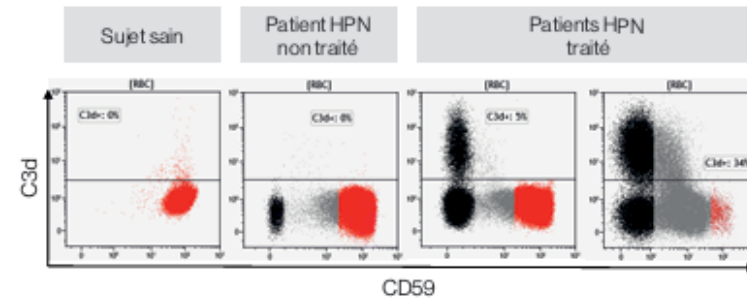
Patient HPN de 48 ans traité par inhibiteur de C5, taille du clone HPN sur les PNNs : 83%, sur les monocytes : 79%, sur les hématies : 29%, sur les iRBCs : 69%

Intérêt de l'analyse de l'expression de C3d sur les hématies¹⁵

Ajout de l'anticorps anti-C3d pour détecter l'expression du C3d sur les hématies

Certains patients HPN traités par inhibiteurs de C5 restent anémiques en raison :

- d'une hémolyse intravasculaire résiduelle
- d'une insuffisance médullaire
- et/ou d'une hémolyse extravasculaire : liée potentiellement au dépôt de C3d sur les hématies GPI déficitaires, entraînant leur destruction par les macrophages hépatospléniques → évaluation de l'expression du C3d en cours dans les LBMR.



Analyse par cytométrie en flux de l'expression du C3d par les hématies de patients HPN traités par inhibiteurs du complément

Dr Maroua Mabrouk

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



Dr Agathe Debliquis

Laboratoire d'Hématologie
Groupe Hospitalier de la Région
Mulhouse Sud Alsace
debliquisa@ghrmsa.fr



Dr Magali Le Garff-Tavernier

Service d'Hématologie Biologique
Hôpital Universitaire Pitié-Salpêtrière
magali.legarff@aphp.fr



Pr Oriane Wagner-Ballon

Département d'Hématologie et Immunologie biologiques
Hôpitaux Universitaires Henri Mondor
orianne.wagnerballon@aphp.fr



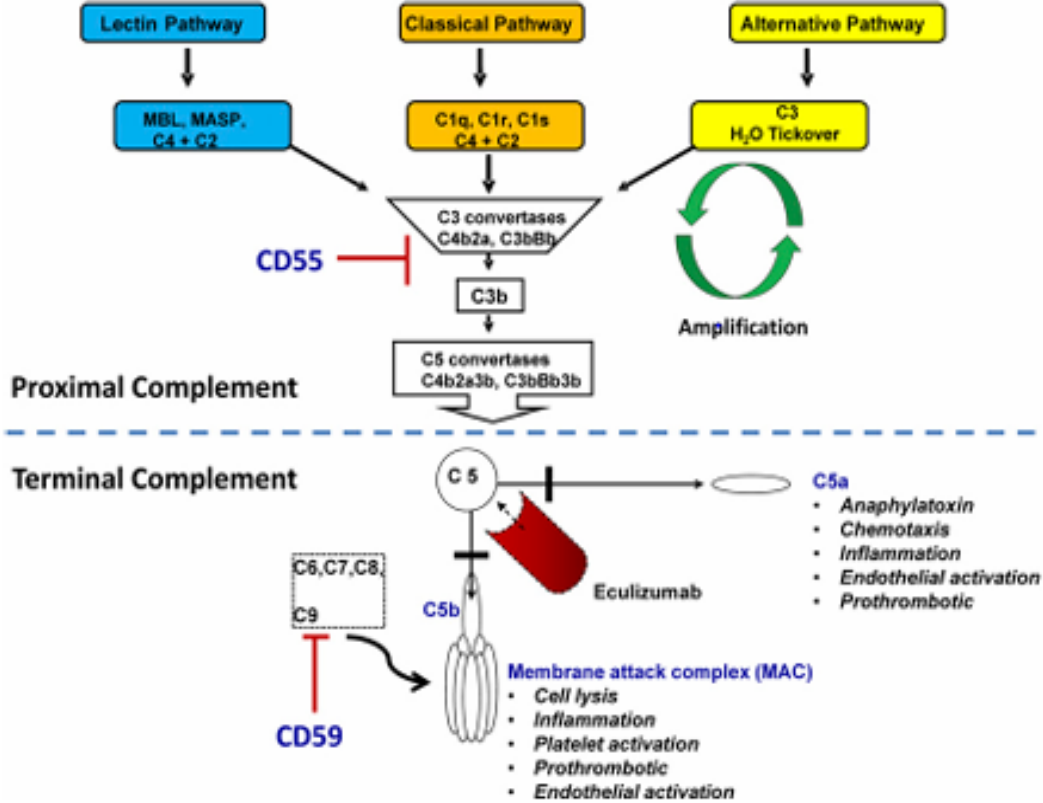
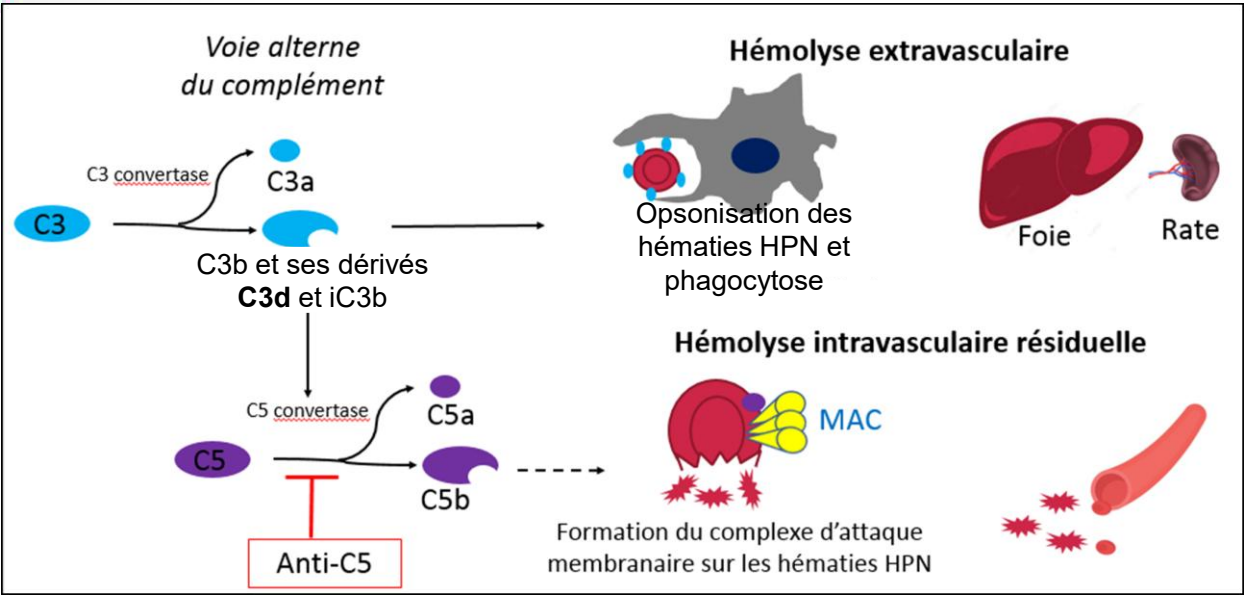
FACULTÉ
DE SANTÉ



AP-HP.
Hôpitaux universitaires
Henri-Mondor

Présentation du projet

Nombreux patients traités par anti-C5 anémiques et/ou dépendants des transfusions : hémolyse extravasculaire associée à l'anti-C5



Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria Robert A. Brodsk, blood 2014

Présentation du projet

Objectif du projet

Évaluer si l'analyse par cytométrie en flux de l'expression de C3d peut identifier les patients les plus éligibles aux inhibiteurs proximaux.

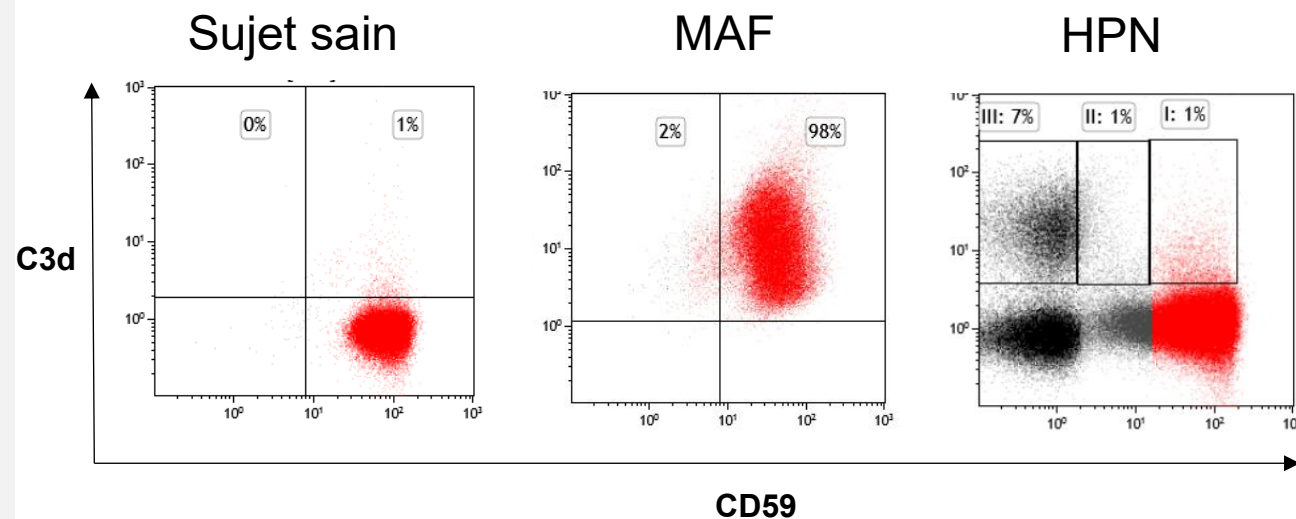
Travail préliminaire

- Réactifs anti-C3d non conjugués compatibles avec le panel de détection de clone HPN sur les hématies
- Contrôles négatifs : sujets sains
- Contrôles positifs : maladie des agglutinines froides (MAF)
- 6 patients HPN traités par anti-C5
- Comparaisons inter-laboratoires entre LBMR (Hôpitaux Pitié-Salpêtrière et Henri-Mondor): résultats similaires

Analyse de la fraction C3 par CMF à la surface des hématies

Blood 2009, Risitano et al

Eculizumab treatment: stochastic occurrence of C3 binding to individual PNH erythrocytes Journal of hematology & oncology 2017, Sica et al



Méthodologie

PHASE



Mise au point de la méthode d'analyse : étude monocentrique au laboratoire d'hématologie du GHRMSA

Comparaison de plusieurs anticorps anti-C3d conjugués et titration : identification des conditions expérimentales les plus performantes et reproductibles



PHASE



Une phase de validation inter-laboratoire :



Agathe
DEBLIQUIS

Organisatrice CytHem-HPN

Laboratoire d'Hématologie
Groupe Hospitalier de la Région Mulhouse
Mulhouse - France



Magali
LE GARFF-TAVERNIER

Organisatrice CytHem-HPN

Service d'Hématologie Biologique
Hôpitaux Universitaires Pitié-Salpêtrière
Paris - France



Oriane
WAGNER-BALLON

Organisatrice CytHem-HPN

Département d'Hématologie et d'Immunologie Biologiques
Hôpital Henri Mondor
Créteil - France



Standardisation et harmonisation de la méthodologie entre les trois LBMR, afin de garantir la robustesse et la comparabilité des résultats sur :

- au moins 5 prélèvements de patients HPN
- un sujet sain (contrôle négatif)
- un patient présentant une maladie des agglutinines froides (contrôle positif).



PHASE



Analyse des patients : Les patients traités par inhibiteurs du complément (anti-C5) pris en charge dans ces centres ainsi qu'à l'hôpital Saint-Louis seront analysés par cytométrie en flux permettant d'élargir la cohorte de l'étude.

Remerciements

Organisateurs du groupe de travail CytHem-HPN:

Agathe Debliquis
Bernard Drénou
Magali Le Garff-Tavernier
Oriane Wagner Ballon



Investigatrices de l'Observatoire:

Magali Le Garff-Tavernier
Oriane Wagner Ballon



Coordinateur du centre de référence

Régis Peffault de Latour
Flore Sicre de Fontbrune



Dr Véronique Frémeaux-Bacchi

Laboratoire d'immunologie, HEGP (APHP)

Membres participants aux CIL et à l'Observatoire



Partenaires industriels

