

Deuxième édition du CoBioMe

Congrès des internes de biologie médicale

Paris, 30 mars 2019

Clément Janot

Bertrand Lefrère

Moïse Michel

Edouard Le Guillou

Bérénice Schell

Syndicat des internes en pharmacie et
biologie médicale d'Ile-de-France, Paris
<congresbiosiphif@gmail.com>

Suite au succès de la première édition qui s'est déroulée l'an dernier, le partenariat du Congrès des internes de Biologie Médicale (CoBioMe) avec les *Annales de Biologie Clinique* est renouvelé et nous proposons dans ce numéro les résumés sélectionnés par le comité scientifique du Syndicat des internes en pharmacie hospitalière d'Ile-de-France (SIPHIF) pour une communication orale au cours du congrès.

Le CoBioMe 2^e édition se tiendra cette année le 30 mars 2019 au Val-de-Grâce.

Comme l'an dernier, les résumés soumis au comité scientifique ont été répartis dans 3 catégories, Biologie hospitalière et Recherche fondamentale, translationnelle et clinique et Cas cliniques originaux. Dans chaque catégorie, 3 résumés ont été sélectionnés pour communication orale « longue » de dix minutes. De plus, 6 autres résumés ont été retenus pour communication orale « courte » (dite « session flash »), c'est-à-dire dont le projet est exposé dans un temps imparti de 180 secondes.

Par ailleurs, cette année, à l'issue du congrès, l'un des travaux présentés en communication orale longue sera sélectionné pour être publié sous forme d'article original dans la revue.

Ce partenariat permet de promouvoir la publication des travaux des internes, sous forme de publication, et d'encourager l'initiative du SIPHIF dans sa démarche de développement de journée scientifique « *par les internes et pour les internes* ».

Catégorie Biologie hospitalière

Évaluation du sulfate de magnésium comme anticoagulant dans les pseudothrombopénies induite par l'EDTA

Mehdi Hage-Sleiman¹, Hippolyte Guérineau¹, Emily Ronez¹, Leyla Calmette¹, Sylvain Clauser^{1,2}, Valérie Bardet^{1,2}

¹ Service d'hématologie-immunologie-transfusion, Hôpitaux Universitaires Paris Ile-de-France Ouest, Hôpital Ambroise Paré, AP-HP, Boulogne-Billancourt, France ;
² Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, France

Introduction

La pseudothrombopénie induite par l'EDTA (PTIE) est un artefact pré-analytique in vitro fréquemment rencontré en routine de laboratoire (0,1 à 2 % des patients hospitalisés), lié à la présence d'auto-anticorps antiplaquettaires dépendants de l'EDTA dirigés contre le récepteur IIb-IIIa. Pour pallier cela, l'approche la plus pratiquée par les laboratoires est la numération plaquettaire sur citrate de sodium avec malheureusement, la présence de contraintes pré-analytiques risquant de sous-estimer cette numération, avec la possible persistance des amas.

Objectif de l'étude

Nous avons voulu évaluer l'intérêt d'un tube (ThromboExact®, Sarstedt) utilisant du sulfate de magnésium (MgSO₄) comme anticoagulant chez des patients présentant une PTIE. Le but de l'étude était de comparer la numération plaquettaire, le volume plaquettaire moyen (VPM) ainsi que les autres paramètres d'hématimétrie, sur de l'EDTA, du citrate ou du MgSO₄ comme anticoagulants.

Patients et méthodes

15 patients présentant une thrombopénie (< 150 G/L) avec la présence d'amas à l'examen microscopique et l'absence de coagulum sur un prélèvement de sang total sur EDTA ont été inclus de mai à décembre 2018.

La numération a été réalisée sur la chaîne XN-3000 (Sysmex®, France), et les frottis sanguins ont été systématiquement observés à la recherche d'amas. Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 7 (GraphPad), étant donné l'effectif faible, des tests non paramétriques ont été utilisés avec comme significativité un $p < 0,05$.

Résultats

Au total 40 échantillons sanguins provenant de 15 patients hospitalisés ou consultants (âge médian, 71 ans) ont été analysés en mode impédance (EDTA et MgSO₄, $n = 15$ et citrate, $n = 10$).

Les médianes des numérations plaquettaires observées sur EDTA, citrate et MgSO₄ (médiane, [min-max]) étaient 45 G/L [20-136], 175 G/L [70-361] et 223 G/L [87-404] respectivement ($p < 10^{-4}$). Le gain moyen plaquettaire était de 104 G/L sur citrate et 173 G/L sur MgSO₄ ($p = 0,123$). 12 patients présentaient une numération > 150 G/L sur MgSO₄ contre trois patients sur citrate, avec la persistance des amas sur 9 échantillons citratés et aucun sur MgSO₄. Le VPM était significativement plus bas sur MgSO₄ que sur EDTA (9,7 [8,5-11,6]) vs (11,2 [10-11,9]) ; $p = 0,002$, et de la même façon plus bas sur citrate que sur EDTA (10,2 [9,0-12,1]) ; $p = 0,001$). Pour les autres paramètres de l'héogramme, il n'y avait pas de différence significative sur la numération des globules rouges, des leucocytes, l'hémoglobine, l'hématocrite, le VGM, la TCMH, seule la CCMH était significativement plus élevée sur MgSO₄ comparé à l'EDTA ($p = 0,008$).

Discussion et conclusion

Le MgSO₄ semble être une alternative supérieure au citrate pour s'affranchir des amas sur EDTA. D'autres études ayant montré l'existence d'un biais de la numération plaquettaire sur MgSO₄ chez des patients sans PTIE, cet anticoagulant pourrait être recommandé uniquement pour estimer la numération plaquettaire lors d'une PTIE.

Diagnostic des infections à parechovirus : quel prélèvement privilégié ? Étude rétrospective monocentrique sur 5 ans

Ludmilla Ogouma Aworet, Emmanuelle Gallois, Brigitte Couzon, Stéphanie Marque Juliet

Service pharmacie, Centre Hospitalier André Mignot, Versailles, France

Introduction

Les parechovirus appartiennent à la famille des Picornaviridae. Ils sont le plus souvent responsables d'infections bénignes voire asymptomatiques, mais peuvent aussi être la cause d'infections sévères (méningites, sepsis du nouveau-né ou du nourrisson) nécessitant un transfert en réanimation. Le diagnostic de ces infections se fait par RT-PCR dans le liquide cébrospinal (LCS) principalement, mais la recherche du génome viral dans d'autres sites (sang, gorge, selles) peut s'avérer utile. Cette étude rétrospective vise à évaluer les performances diagnostiques de la PCR selon le type de prélèvement analysé.

Matériel et méthode

L'ensemble des résultats de PCR de prélèvements de sang (plasma), gorge, selles et LCS de nouveau-nés (âge < 28 jours) et de nourrissons (âge entre 28 jours et 2 ans) réalisés entre février 2013 et novembre 2018 ont été étudiés. Les informations cliniques ont été recueillies à partir de dossiers médicaux.

Résultats

375 prélèvements de 314 enfants ont été reçus pendant cette période. 24 des 375 prélèvements (6,4 %) étaient positifs à parechovirus, soit 17 enfants sur 314. Le taux de positivité dans le sang est de 15 % (7/48) contre 3 % dans le LCS (10/298). Le Ct (cycle threshold) de positivité moyen des prélèvements de LCS était de 36 cycles, tandis que celui des plasmas était de 30 cycles. Pour 6 des 17 patients (35 %), la PCR parechovirus était négative ou ininterprétable dans le LCR et positive dans un ou plusieurs autres sites périphériques (sang, gorge et selles).

Parmi les patients avec une PCR parechovirus positive, 16 ont été amenés aux urgences pour fièvre (soit 94 %). Les signes associés étaient des signes de mauvaise tolérance (dyspnée avec désaturation, tachycardie, marbrures, $n = 7$, 41 %), une diarrhée ($n = 4$, 24 %), une diminution de la prise alimentaire ($n = 2$, 12 %), une constipation ($n = 1$, 6 %) et un syndrome méningé avec hypotonie et vomissements en jet ($n = 1$, 6 %). Au moins un remplissage vasculaire a été nécessaire pour 2 patients (12 %) et 3 patients (18 %).

ont été transférés en réanimation. L'âge moyen des patients infectés par le parechovirus était de 29 jours.

Discussion et conclusion

L'infection à parechovirus est rare et touche très majoritairement les nouveau-nés et nourrissons. Elle reste néanmoins importante à caractériser devant une présentation clinique de méningite ou mimant un sepsis bactérien pouvant mener à des signes de gravité voire à un transfert en réanimation. Son diagnostic précoce permet également d'arrêter un traitement antibiotique. Devant le jeune âge des patients touchés, une ponction lombaire est souvent réalisée mais cette étude rétrospective suggère qu'il faut y associer un prélèvement sanguin ou d'un autre site périphérique pour ne pas méconnaître ce diagnostic.

Evaluation du β -lacta testTM pour la détection de la résistance aux céphalosporines de 3^e génération dans les hémocultures positives à entérobactéries : comparaison de deux méthodes

Charlotte Panissard¹, Florence Morel¹, Jérôme Robert¹

¹ GH Pitié-Salpêtrière Charles Foix, Laboratoire de bactériologie-hygiène hospitalière, Paris, France

Ce travail avait pour objectif d'évaluer un test chromogénique rapide, le β -lacta testTM (BLT) pour la détection de la résistance aux céphalosporines de 3^e génération (C3G) chez les bacilles à Gram négatif (BGN) de type entérobactérie (EB) isolés dans les flacons d'hémocultures en comparant deux méthodes. Les bactériémies à BGN constituent une urgence thérapeutique ; une antibiothérapie empirique efficace est donc cruciale pour le pronostic du patient. La sensibilité aux C3G, traitement de premier recours, n'est confirmée qu'après 18-24h d'incubation de l'antibiogramme. Or actuellement, l'incidence élevée des EB résistantes aux C3G par production de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) pose un double problème : (i) le risque d'une antibiothérapie empirique inadaptée et (ii) le recours croissant à des β -lactamines à large spectre, les carbapénèmes. Dans ce contexte, le BLT, test rapide (15 minutes), présente un véritable avantage car il peut être réalisé sur colonies après 4h d'incubation à 37 °C de la subculture du flacon d'hémoculture. Ce test peut même être fait directement à partir du prélèvement sur culot bactérien après plusieurs étapes de centrifugation. Ces deux méthodes ont été réalisées en parallèle, en prospectif, en monocentrique, sur 100 hémocultures consécutives positives à EB en excluant les doublons. Un antibiogramme a été réalisé à

chaque fois pour évaluer le phénotype de résistance aux β -lactamines. Enfin, les souches présentant un phénotype de BLSE sur l'antibiogramme ont été caractérisées par PCR simplex + séquençage des gènes blaCTX-M-1, blaCTX-M-2, blaCTXM-9, blaTEM et blaSHV. La méthode directe sur culot semble être moins sensible pour la détection des BLSE que la méthode sur subculture (43,8 % vs 81,3 % respectivement). De plus, elle nécessite un travail technique plus long et délicat qui est difficilement réalisable en routine. La méthode sur subculture présente l'avantage, outre une réalisation plus facile et rapide, de pouvoir être couplée à l'identification par le MALDI-TOF ce qui est important pour orienter l'antibiothérapie. Par ailleurs, le BLT présente une bonne valeur prédictive négative pour les deux méthodes (88,5 et 98,8 % respectivement). Cette étude montre également une mauvaise performance du BLT pour la détection de la résistance aux C3G par hyperproduction de céphalosporinase sur les 5 souches de l'étude. La biologie moléculaire a permis de mettre en évidence que le BLT possède de bonnes performances pour la détection des BLSE de type CTX-M qui sont les plus répandues actuellement ; à l'inverse, une sensibilité nettement inférieure a été observée sur les EB productrices de BLSE de type TEM et SHV. La poursuite de cette étude sur un volume d'échantillons plus important serait nécessaire pour corroborer ces premiers résultats.

Juste prescription des examens de biologie médicale : quelles perspectives de valorisation ?

Sylvie Abraham, Amandine Henry, Marlene Amara, Stéphanie Marque Juillet

Service pharmacie, Centre Hospitalier André Mignot, Versailles, France

Introduction

Le Comité français d'accréditation considère le biologiste comme garant de la juste prescription des examens de biologie médicale (EBM). À l'aide des renseignements cliniques, le biologiste doit être en mesure d'évaluer la pertinence des examens prescrits et de conseiller le prescripteur si besoin. D'autre part, la réduction des dépenses liées à la prescription d'actes inutiles et redondants est l'un des axes évoqués par le ministère dans le cadre de la réforme de la santé. De ce fait, la juste prescription des EBM fait désormais partie des missions quotidiennes du biologiste, quel que soit son secteur d'activité. Ce dernier évalue la pertinence des prescriptions et ajoute ou annule, en accord avec le clinicien, certaines analyses. Cependant, ce travail n'est pas valorisé.

L'objectif de notre étude est d'évaluer la non dépense et l'intérêt de la revue des prescriptions systématiques dans le secteur de sérologie-virologie de notre établissement.

Matériel et méthodes

Depuis janvier 2018, un paramétrage du système de gestion informatique du laboratoire (SGL : Molis) aide à la revue des prescriptions : redondances générant un résultat bloquant la réalisation de l'analyse ; validation du biologiste permettant soit une libération de l'analyse au niveau de la technique soit une annulation de l'examen avec justification ; code « examen annulé à l'initiative du biologiste » remplaçant le résultat et ne générant pas de facturation simplifiant l'extraction des données. L'extraction et l'analyse de l'ensemble des EBM annulés par le biologiste via le SGL sur une période de 11 mois a été effectuée.

Résultats

Entre le 1^{er} janvier et le 30 novembre 2018, 55 531 EBM ont été réalisés dans le secteur de sérologie-virologie pour un total de 8 616 278 B et BHN. 2 415 analyses (4,35 %) ont été supprimées, soit 5,97 % des actes en B et BHN : les 3 examens les plus fréquemment annulés sont l'antigène HBs (11,6 %), les anticorps anti-HBc (11,5 %) et la PCR Entérovirus (9,7 %) ; 39,2 % des analyses sont annulées après discussion clinico-biologique ; 36,6 % des analyses sont non justifiées en s'appuyant sur diverses recommandations (REMIC, HAS...) et ne nécessitent pas de dialogue clinico-biologique ; 22,7 % des examens sont redondants.

Conclusion

Cette activité de juste prescription est chronophage et non valorisée car elle aboutit le plus souvent à des annulations d'analyse. Cependant, elle favorise le dialogue clinico-biologique permettant ainsi d'améliorer le service médical rendu.

L'extraction des EBM annulés a permis de chiffrer l'activité économisée grâce à la juste prescription et d'en faire un retour à l'administration. Le paramétrage du SGL est indispensable à la bonne réalisation et au suivi de la revue des prescriptions. La valorisation des non dépenses va devenir ces prochaines années un indicateur qualité constructif pour les centres hospitaliers.

Des actions correctives telles que la formation des prescripteurs sur les EBM les plus mal prescrits vont être mises en place.

Neutralisation des anticoagulants oraux directs (AOD) par le charbon activé DOAC-Remove® pour la recherche de facteurs de risque biologiques de thrombose veineuse

Yasmina Talb, Sara Zia-chahabi, Rémy Favre, Pascale Manzi, Pauline Plu, Elodie Saksik, Sonia Doan, Sonia Pinheiro-Vaz, Claire Flaujac

Service d'hématologie biologique, Centre hospitalier de Versailles-André Mignot, France

Introduction

Les AOD interfèrent avec des tests d'hémostase, conduisant à une surestimation de l'activité de la protéine C (PC), de la protéine S (PS), ou à de faux positifs du temps de venin vipère Russel dilué (dRVVT), test recommandé pour la recherche d'anticoagulant circulant de type lupique (ACC). Le charbon activé DOAC-Remove® est proposé pour neutraliser *in vitro* des AOD. L'objectif de l'étude est d'évaluer l'impact avant et après neutralisation par le DOAC-Remove®, sur la mesure des PC, PS et dRVVT, chez des patients traités par AOD.

Matériel et méthodes

25 patients traités par AOD pour une maladie thromboembolique veineuse (15 rivaroxaban ; 10 apixaban) ; 3 patients avec un dRVVT positif (2 sous héparine de bas poids moléculaire (HBPM) ; 1 sans traitement) ; 5 patients sous héparine non fractionnée (HNF) et 5 sous HBPM.

L'intégralité des analyses a été réalisée sur STAR MAX® (Stago) : les activités anti-Xa rivaroxaban, apixaban, HNF et HBPM, les PC, PS, et dRVVT respectivement avec STA-liquid anti-Xa, Staclot®-Protein C, Staclot®-Protein S et Staclot®-DRVV (Stago). Ces paramètres ont été redosés après 5 minutes d'incubation avec une pastille DOAC-Remove® (5-Diagnostics AG).

Résultats

Chez les patients sous AOD, après ajout de charbon activé, il existe un raccourcissement significatif des taux de prothrombine (TP) ($p = 0,0025$) et temps de céphaline kaolin (TCK) ($p = 0,0059$), mais pas du fibrinogène ($p = 0,63$). La concentration médiane de rivaroxaban ($n = 15$) passe de 213 ng/mL [61;922] à 25 ng/mL [25;29] ($p < 0,0001$), celle de l'apixaban ($n = 10$) de 165 ng/mL [80;634] à 23 ng/mL [23;28] ($p = 0,0020$). La PC passe de 136 % à 125 % ($p = 0,036$; $n = 10$) et la PS de 111 % à 94 %

($p = 0,019$; $n = 10$). Ces inhibiteurs de la coagulation diminuent significativement après neutralisation des AOD, sauf pour un patient dont les taux de PC/PS augmentent. Aucun ACC initialement mis en évidence sur 46 % des PTT-LA (6/13 patients) et 83 % des dRVVT (10/12 patients) n'a été retrouvé après neutralisation des AOD, ce qui est cohérent avec l'absence d'anticorps anti-cardiolipine ou anti-bêta2Gp1. Un patient a nécessité un test de confirmation du dRVV (ratio normalisé 1.11). Les 3 patients connus ACC positif, restent positifs sans modification des ratios normalisés après DOAC-Remove®.

Chez les patients sous HNF et HBPM, il n'y a pas d'impact du charbon activé sur le TP, TCK, fibrinogène et l'activité anti-Xa HBPM ($p > 0,05$).

Discussion

Nous confirmons dans notre étude la neutralisation plasmatique du rivaroxaban et de l'apixaban par le charbon activé sans modification des anti-Xa HBPM, TP, TCK et fibrinogène. L'HNF semble être adsorbée par le charbon activé contrairement aux HBPM. Son utilisation chez les patients sous AOD permet de diminuer le risque de faux positifs des ACC et diminue l'interférence sur les dosages de PC/PS. La confirmation de ces résultats dans une plus grande cohorte permettrait de valider la réalisation des bilans de thrombophilie chez des patients sous AOD.

Développement et validation d'une méthode de dosage multiélémentaire en ICP-HRMS après minéralisation en four à micro-ondes. Profil tissulaire des métaux chez 31 patients décédés

Marie Martin^{1,2}, Isabelle Etting¹, Stanislas Grassin-Delyle², Jean-Claude Alvarez^{1,2}

¹ Laboratoire de toxicologie, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France ; ² Plateforme MasSpecLab, UMR1173, Inserm, Montigny-le-Bretonneux, France

Objectif

L'analyse des éléments traces présente un intérêt en toxicologie médico-légale et clinique, notamment dans le suivi de l'exposition professionnelle. Les matrices habituellement utilisées sont le sang et les urines, parfois indisponibles dans le cadre des autopsies. L'analyse des cheveux et des viscères peut alors être réalisée. Une méthode de dosage simultané de 38 éléments métalliques par ICP-HRMS après minéralisation par micro-ondes a été validée et a permis d'établir les profils tissulaires de 31 patients décédés.

Méthode

15 mg de foie, cœur, rein, cerveau, poumon et cheveux de 31 patients autopsiés ont été pesés puis minéralisés en tubes en quartz en présence d'étalons internes (Sc, Ga, In, Ir), d'HNO₃ et d'H₂O₂ sous l'action de micro-ondes (UltraWAVE®, Milestone). La détection et la quantification sont réalisées avec un Element XR (ThermoFisher). Trente-huit éléments sont quantifiés simultanément avec une courbe de calibration de 10 à 15 points : Sb, Ag, As, Ba, Be, Bi, Cd, Ce, Cs, Cr, Co, Cu, Sn, Fe, Ge, Hf, La, Mn, Hg, Mo, Ni, Au, Pd, Pt, Pb, Rb, Ru, Se, Sr, Te, Tl, Th, Ti, W, U, V, Zn, Zr. La méthode a été validée selon les recommandations de la Société française de biologie clinique en utilisant des matériaux de référence de l'Institut national de santé publique du Québec comportant 25 éléments et 3 contrôles de qualité interne pour les éléments restants.

Résultats

La minéralisation des échantillons a abouti à une digestion totale et rapide. Les courbes de calibrations sont linéaires ($r < 0,996$) dans un large intervalle de concentrations, pertinent avec les concentrations habituellement observées. Les limites inférieures et supérieures de quantification sont comprises respectivement entre 1.10⁻⁷ et 10 μM et entre 1.10⁻³ et 500 μM selon l'élément. La précision intra- et inter-jour est satisfaisante (CV < 15 %) pour tous les éléments en basse, moyenne et haute résolutions.

La plupart des éléments traces sont répartis de manière homogène dans les tissus des sujets étudiés, excepté une augmentation du Cd, Mn, Co dans le rein (organe d'élimination) et du Mo, Ce et Pb dans le foie (organe à fonction métabolique). Les concentrations s'étendent du pg/g (Th) au mg/g (Fe) en fonction des éléments. Les métaux s'incorporent dans les cheveux, représentatifs d'une exposition sur le long terme.

Conclusion

La méthode développée et validée permet le dosage simultané de 38 éléments. La minéralisation par micro-ondes génère des échantillons totalement minéralisés et homogènes. Elle permet de s'affranchir de la matrice utilisée et garantit une libération totale des éléments contenus dans cette matrice. Cette première méthode avec minéralisation est applicable à toute matrice solide, y compris les viscères. L'analyse des tissus, prélèvements alternatifs aux sang et urine, présente un intérêt majeur pour évaluer l'exposition aux métaux en post-mortem. Les cheveux sont une matrice de choix, notamment en toxicologie environnementale.

Catégorie Recherche

Décryptage par séquençage haut débit d'une épidémie d'adénovirus humain F41 chez des enfants recevant une greffe de cellules souches hématopoïétiques

Caroline Lefevre, Maud Salmona, Linda Feghoul, Noémie Ranger, Séverine Mercier-Delarue, Laure Nizery, Aurelia Alimi, Jean-Hugues Dalle, Jérôme Le Goff

Université Paris-Diderot, Sorbonne-Paris-Cité, Département d'hématologie, Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France ; Université Paris-Diderot, Sorbonne-Paris-Cité, Inserm U941, Laboratoire de microbiologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France

Introduction

Les adénovirus humains (HAdV) sont des virus à ADN classés en 7 espèces (A à G). Les infections à HAdV représentent une cause majeure de mortalité et de morbidité chez les enfants allogreffés de cellules souches hématopoïétiques (CSH), en particulier avec les espèces HAdV A et C qui persistent dans l'intestin et se réactivent lors de l'immunosuppression. Une recherche hebdomadaire dans les selles et le sang par PCR quantitative est réalisée dans notre centre chez tous les patients allogreffés de CSH. Entre mars et juillet 2018, des infections HAdV F41 ont été identifiées chez cinq enfants ayant reçu une allogreffe de CSH dans un service d'hématologie pédiatrique. Nous rapportons ici l'évolution clinique de l'infection par le virus HAdV F41 chez ces patients et l'enquête phylogénétique visant à identifier une transmission potentielle entre les enfants.

Matériels et méthodes

La détermination du type HAdV a été obtenue par séquençage Sanger du gène de la fibre. Le génome entier a été obtenu par séquençage haut débit. L'alignement et l'analyse phylogénétique des génomes obtenus ont été réalisés respectivement par MAFFT et MEGA 7 avec 16 génomes de référence HAdV F (GenBank).

Résultats

Les premières détections dans les selles ont été rapportées les semaines (S) 18 (patient #1), S26 (#2), S21 (#3), S11 (#4), S15 (#5). L'ensemble des patients présentait une diarrhée sévère, avec des charges virales maximales HAdV dans les selles allant de 6,61 à > 9 log₁₀ copies/mL. L'analyse phylogénétique sur le génome complet a révélé un cluster

comprenant les patients #1, #2 et #3. Cela suggère un cas de transmission entre patients et deux autres infections indépendantes (#4 et #5). Le séquençage du gène de la fibre n'a pas permis de distinguer le patient #5 du cluster de transmission. Quatre patients présentant une virémie HAdV (#1, #2, #4, #5) ont reçu un traitement antiviral par cidofovir (#2,#4,#5) ou cidofovir et brincidofovir (#1). Le traitement antiviral a permis de contrôler la virémie. Deux patients sont décédés, aucun décès n'a été attribué à HAdV.

Conclusion

Les HAdV F41 se répliquent à des taux très élevés dans l'intestin et représentent donc un risque élevé de transmission entre les patients dans un service clinique. Dans cette étude, l'analyse phylogénétique sur le génome entier a permis d'identifier les infections liées et indépendantes de manière plus informative que celle sur le gène de la fibre. Des mesures de détection et de contrôle rapides de l'infection sont nécessaires pour réduire le risque de propagation dans l'environnement. L'administration précoce d'antiviraux, permettant la résolution des symptômes et la clairance du virus dans le plasma et les selles, peut être bénéfique pour prévenir la transmission nosocomiale.

Développement d'une méthode alternative d'étude de toxicité dans un modèle *in vivo* *Caenorhabditis elegans*

Paméla Duguès^{1,2}, Nicolas Fabresse^{1,2}, Song-Hua Lee³, Lisa Martino³, Christian Serre⁴, Philippe Manivet³, Luc Lenglet³, Jean-Claude Alvarez^{1,2}

¹ Laboratoire de toxicologie, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France ; ² Plateforme MasSpecLab, UMR 1173, Inserm, Montigny-le-Bretonneux, France ; ³ CeleScreen, Paris, France ; ⁴ Institut des Matériaux Poreux de Paris, FRE 2000, CNRS - ENS - ESPCI, PSL Research University, Paris, France

Ce travail a pour objectif d'évaluer l'intérêt du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) comme modèle alternatif aux essais chez l'animal pour les études toxicologiques. En plus d'éviter l'utilisation d'animaux, le développement d'un modèle miniaturisé mimant la toxicité observée chez l'homme faciliterait l'évaluation toxicologique en anticipant ces toxicités pouvant échapper aux méthodes de criblage toxicologique classiques *in vitro*. Chaque ver adulte hermaphrodite conduit à une population génétiquement identique avec un cycle de développement de 3 jours et constant. Il présente de nombreuses similitudes avec l'homme, notamment 60 % d'homologie génétique, des systèmes de détoxification des xénobio-

tiques et un système digestif. Cependant, *C. elegans* absorbe par voie orale seulement quelques composés chimiques de façon naturelle. Une stratégie innovante de vectorisation dans des nanoparticules organométalliques solides poreuses (MOFs), le trimésate de fer (III) mésoporeux (MIL-100), a été évaluée afin d'accroître la diversité des xénobiotiques ingérés.

L'évaluation du modèle a été réalisée sur une molécule dont la toxicité est bien décrite : le méthotrexate (MTX). La toxicité a été évaluée sur la souche sauvage N2 de *C. elegans* selon deux approches : (1) en l'exposant à des concentrations de 0,1 à 50 mg/mL de MTX dilué dans le milieu de culture, (2) en lui administrant par voie orale du MTX encapsulé dans 1 mg de MIL-100, mélangé avec *Escherichia coli* OP50 dont il se nourrit. La toxicité a été évaluée en déterminant le nombre d'embryons et de larves écloses à la loupe binoculaire pour estimer l'impact sur la reproduction. La quantification du MTX dans les vers et les MOFs a été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, afin d'estimer le rendement d'encapsulation et la quantité de MTX absorbée par les vers. Le MTX a été encapsulé avec succès dans les MOFs, avec des rendements significatifs allant de 18 à 33 % (mg MTX/mg MOFs). Il est létal à haute concentration pour les vers exposés : (1) la médiane de survie est de 2 jours pour une concentration d'exposition de 50 mg/mL et de 6 jours à 5 mg/mL pour une durée de vie normale d'environ 20 jours. Le MTX est reprotoxique à plus faible concentration : (1) il diminue de 23 % et 95 % l'éclosion des larves aux concentrations d'exposition de 0,01 et 0,1 mg/mL respectivement ; (2) moins de 5 % des larves éclosent après absorption orale du MTX encapsulé.

En conclusion, l'utilisation de *C. elegans* associé à une vectorisation par MOFs semble être un modèle alternatif intéressant aux essais chez l'animal pour les études d'évaluation de la toxicité des médicaments ou produits cosmétiques.

Etude de profils génétiques atypiques pour identifier des gènes modificateurs dans l'hypophosphatasie

Emanuelle Benaloun, Agnès Tailandier, Christelle Domingues, Brigitte Simon-Bou, Christine Muti, Mihelaiti Guberto, Etienne Mornet

Laboratoire SESEP, Centre Hospitalier de Versailles, France

Introduction

L'hypophosphatasie est une maladie héréditaire monogénique multisystémique mais affectant essentiellement la minéralisation osseuse et dentaire.

La maladie est due à des mutations du gène ALPL codant la phosphatase alcaline tissu-non spécifique (TNAP), un acteur central de la minéralisation qui par ailleurs fait intervenir un ensemble d'autres gènes eux-mêmes responsables de pathologies génétiques lorsqu'ils sont mutés. Le but de ce travail est de caractériser le phénotype de patients qui portent des mutations dans l'un de ces gènes, ainsi qu'une mutation dans le gène ALPL afin de mieux comprendre l'implication de ces gènes dans le phénotype hypophosphatasique et leur rôle possible comme gènes modificateurs.

Méthode

Sur la période 2015-2018 nous avons étudié par NGS dans le cadre du diagnostic de l'HPP 268 patients. Les patients portant à la fois une mutation dans ALPL et au moins une autre mutation d'un des gènes du panel testé ont été retenus. Ce panel comprenait, outre le gène ALPL, les gènes ANKH, COL1A1, COL1A2, ENPP1, FGFR3, PHOSPHO1, PTH1R, PTH2R, SOX9, SPP1, TNFRSF11A, choisis en raison de leur rôle dans le processus de minéralisation. Il s'agit donc de gènes de diagnostic différentiel de l'hypophosphatasie et/ou susceptibles d'être des gènes modificateurs.

Chaque variant trouvé dans l'un de ces gènes a été classé selon les recommandations officielles de l'ACMG. Les patients porteurs de variants pathogènes ou de signification inconnue ont été retenus et leur phénotype comparé à celui de patients porteurs uniquement de la mutation ALPL, lorsqu'ils existent dans notre base de données. Des critères de sévérité tels que l'âge au diagnostic, le taux de phosphatases alcalines ou l'existence ou non de fractures seront utilisés pour déterminer si les phénotypes sont comparables (pas d'effet du 2^e gène) ou différents (effet du 2^e gène) et lorsqu'il y a des différences, attribuer les parts respectives de chaque gène dans le phénotype du patient.

Résultats et discussion

Actuellement douze patients ont été retenus porteurs de variants de classe 3, 4 ou 5 dans les gènes COL1A, FGFR3, PTH1R, ANKH, PTH2R, ENPP1 et SOX9. Les résultats préliminaires à ce jour suggèrent qu'au moins deux de ces gènes modulent le phénotype hypophosphatasique. La totalité des résultats sera présentée et discutée lors du congrès CoBioMe.

Conclusion

Ce travail devrait contribuer à l'identification de gènes modificateurs du phénotype hypophosphatasique et à une

meilleure compréhension de l'implication de ces gènes dans la minéralisation osseuse et dans la physiopathologie de l'hypophosphatasie. Comme pour de nombreuses maladies génétiques, l'hypophosphatasie n'est probablement pas une maladie strictement monogénique mais plutôt oligogénique dans laquelle le phénotype hypophosphatasique résulterait de la combinaison de mutations du gène ALPL et de variants, pathogènes ou non, dans d'autres gènes.

Le lysat plaquettaire traité par un processus inactivant les pathogènes favorise la prolifération et maintient le pouvoir anti-inflammatoire des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine

Hélène Vantomme, Amandine François, El Imran Daoudii, Elodie Busson, Frédérique Tissède, Christophe Martinaud

Centre de transfusion sanguine, Hôpital d'instruction des armées Percy, Clamart, France

Introduction

Les lysats plaquettaires humains sont une alternative intéressante et dénuée de risque xénogénique à l'utilisation du sérum de veau fœtal (SVF) pour la culture des cellules stromales mésenchymateuses (CSM). La diminution du risque infectieux ainsi que l'efficacité renforcée sur la prolifération cellulaire sont des arguments qui justifient leur emploi. Depuis mai 2018, le traitement des dons plaquettaires par un procédé d'inactivation de pathogènes est rendu obligatoire en France. Les impacts du traitement de ces lysats plaquettaires par amotosalen sur l'expansion des CSM et le maintien de leurs propriétés fonctionnelles restent incertains.

Objectif

Cette étude a pour but d'évaluer les impacts du prétraitement par amotosalen des dons plaquettaires sur leur capacité à soutenir la prolifération cellulaire et à maintenir leur fonction.

Méthodes

6 lots de concentrés de plaquettes issus d'aphérèse (CPA) et 9 mélanges de concentrés plaquettaires (MCP) ont été traités par amotosalen dans les 24 heures suivant le prélèvement. Ils sont testés sur des échantillons de CSM humaines issues de moelle osseuse d'un même donneur sain. La prolifération cellulaire des CSM est évaluée sur deux passages tandis que leur capacité immunomodulatrice est étudiée à l'issue du deuxième passage. La prolifération cellulaire est jugée à partir du temps de doublement et du taux de prolifération à chaque passage (P1 et P2). La capacité immunomodulatrice des CSM s'apprécie par l'analyse de leur potentiel inhibiteur sur la sécrétion de TNF en présence de cellules d'une lignée macrophagique et de LPS. Un lot de lysat plaquettaire de grade clinique (LPC) validé et qualifié, un lot de LPC industriel qualifié et le SVF ont servi de témoins. Les données sont analysées statistiquement par un test de Man et Whitney.

Résultats

Les CSM cultivées avec des lysats plaquettaires inactivés (LPi) présentent une plus faible prolifération aux passages P1 et P2, notamment avec un temps de doublement supérieur à chaque passage par rapport aux CSM cultivées avec les témoins et un moindre taux de prolifération. On note également que les lots de CPA ont une meilleure efficacité que les MCP pour la prolifération des CSM au premier passage. Cependant, le potentiel anti-inflammatoire semble être identique entre les CSM cultivées avec les LPi et celles des témoins. Le taux d'inhibition de sécrétion de TNF ne diffère pas entre ces deux populations.

Conclusion

Le traitement d'inactivation de lots plaquettaires à l'amotosalen modifie certaines propriétés de culture des CSM. En effet, ce traitement diminue le potentiel prolifératif des CSM notamment lors du premier passage. Cependant, ces CSM cultivées avec des LPi semblent conserver la même puissance anti-inflammatoire *in vitro*, cette observation devra être complétée par l'analyse des derniers échantillons. Le LPi peut être utilisé comme adjuvant de culture de CSM, de préférence à partir d'aphérèse d'un donneur.