

Troisième édition du CoBioMe

Congrès des internes de Biologie médicale

Paris, 7 mars 2020

Charles Marchionini

Amandine Caillault

Théophile Cocherie

Floriane Devaux

Lise Larcher

Edouard Le Guillou

Lorra Monpierre

Céline Mory

Clémentine Moulin

Laurence Pacot

Inès Rezzoug

Audrey Sabbagh

Bérénice Schell

Marie Temple

Pauline Thiebot

Hélène Vantomme

Eve-Marie Walle

Syndicat des internes en pharmacie
et biologie médicale d'Ile-de-France,
Paris, France

Le mot du comité d'organisation

Charles Marchionini, Pauline Thiebot, Hélène Vantomme

Pour la troisième année consécutive, le Syndicat des internes en pharmacie et biologie médicale d'Ile-de-France (SIPHIF) a organisé son propre congrès CoBioMe le samedi 7 mars 2020 à l'hôpital Saint-Louis à Paris en partenariat avec les *Annales de Biologie Clinique*.

Comme chaque année, les internes de biologie médicale d'Ile-de-France ont pu soumettre leur résumé dans l'une des trois catégories que sont « Biologie hospitalière », « Recherche fondamentale, translationnelle et clinique », et « Cas cliniques originaux ». À la suite de ces soumissions, le comité scientifique a pu sélectionner 3 résumés pour

la réalisation d'une communication longue de 10 minutes maximum dans chacune des catégories et 6 résumés pour une communication flash de 3 minutes.

À l'issue de cette journée, le comité scientifique du congrès a pu délibérer et attribuer un prix par catégorie pour les communications longues et un prix pour une communication flash.

Par ailleurs, l'interne ayant remporté le prix dans la catégorie « cas clinique original » en publication longue aura son travail publié sous forme d'un article original dans un prochain numéro des *Annales de Biologie Clinique*.

Le CoBioMe est devenu un événement privilégié pour les internes de biologie médicale afin de valoriser leurs travaux, communiquer dans un contexte scientifique et récompenser l'implication des internes dans des travaux académiques. Cette journée est à présent un incontournable de la vie de l'internat de biologie médicale à Paris.

Correspondance :
<congrèsbiosiphif@gmail.com>

Session « Cas cliniques originaux »

Prolifération de cellules dendritiques plasmocytoïdes associée... une hémopathie : autour d'un cas

Marie Temple¹, Jennifer Osman¹, Rémy Favre¹, Sophie Rigau², Francine Garnache-Ottou³, Victoria Ragueneau¹, Benjamin Maneglier¹

Service de biochimie générale, CHU de Rouen, France ; 1 Service de biologie médicale, Centre hospitalier André Mignot, Le Chesnay, France ; 2 Service d'hématologie, Centre hospitalier André Mignot, Le Chesnay, France ; 3 Laboratoire de cytologie, Etablissement français du sang, Besançon, France

Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) sont des cellules immunomodulatrices sécrétant de l'interféron alpha et interagissant avec les lymphocytes T. La classification OMS 2017 distingue deux entités pathologiques : les proliférations de précurseurs de pDC, à l'origine de la leucémie à pDC et les proliférations de pDC matures (MPDCP) associées à une hémopathie myéloïde (entité provisoire).

Monsieur M., 57 ans, en rémission complète d'un myélome multiple stade III, est actuellement en traitement d'entretien par daratumumab. Il consulte pour la dernière cure de son traitement. À l'examen clinique, le patient présente des pétéchies, sans syndrome tumoral ni autre lésion cutanée, motivant la réalisation d'une numération sanguine (NFS). La NFS retrouve une anémie macrocytaire (7,4 g/dL VU : 13-18 g/dL), une thrombopénie sévère (20 G/L VU : 150-400 G/L) associées à une monocytose (3,7 G/L VU : 0,15-1 G/L) et 5 % de blastes indifférenciés.

Le myélogramme montre une moelle très riche, avec une hyperplasie de la lignée granuleuse (neutrophiles, éosinophiles et monocytes) et des signes de dysgranulopoïèse, sans excès de plasmocytes. On observe également 13 % de blastes lymphoïdes B de phénotype CD19+22+/10-, exprimant de manière aberrante un marqueur myéloïde (CD13+), ainsi qu'un contingent de cellules atypiques représentant 8 % des cellules médullaires, co-exprimant les antigènes CD4+123+303+304+FcER1+BadLamp+CD43+CD7+ sans expression de l'antigène cTCL1. Leur morphologie et immunophénotype (CD56-) correspondent à des pDC matures. Les analyses cytogénétiques et moléculaires mettent en évidence un remaniement de KMT2A (MLL) avec ARHGEF12, translocation décrite une seule fois dans un cas de leucémie aiguë myéloïde (LAM), ainsi que des mutations habituellement décrites dans les hémopathies myéloïdes (NRASG13D, DNMT3A757D et R792 et RUNX1F136C). Le transcrite de fusion BCR-ABL n'a pas

été retrouvé. Le TEP scan est en faveur d'une hémopathie exclusivement médullaire.

Les MPDCP associées à une hémopathie sont très rares (80 cas publiés), de mauvais pronostic, plus fréquemment diagnostiquées chez l'homme avec un âge médian au diagnostic de 69 ans. L'hémopathie myéloïde la plus souvent associée est la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), mais des associations avec des syndromes myélodysplasiques ou des LAM ont aussi été rapportées.

Nous décrivons ici un cas de MPDCP associée à une probable LMMC et à un excès de lymphoblastes B, chez un patient traité et autogreffé pour un myélome multiple. Un autre cas de MPDCP associé à une LMMC et une leucémie aiguë lymphoblastique T a été documenté dans la cohorte française. Les données de cette cohorte (en cours d'analyse) montrent, sur des cas similaires, des profils mutationnels communs entre les différentes populations blastiques, pDC et monocytaires. Après concertation pluridisciplinaire, un traitement par tagraxofusp (anti-CD123) suivie d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques a été décidé.

Pandoraea pnomenus : un pathogène méconnu dans la mucoviscidose ? À propos d'un cas

Théophile Cocherie, Pauline Bargain, Emmanuelle Coirier-Duet, Anne-Gaëlle Cauchie, Amandine Henry, Stéphanie Marque-Juillet, Marlène Amara

Service de microbiologie, CH André Mignot de Versailles, Le Chesnay, France

L'observation

Un enfant de 9 ans atteint de mucoviscidose présente une altération de l'état général avec toux persistante, perte de poids et majoration d'une dyspnée d'effort. Il est hospitalisé pour éradication d'une colonisation pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* objectivée à Dubaï, son lieu de résidence. Un examen cytotactériologique des crachats (ECBC) effectué sous ciprofloxacine est réalisé au début de son hospitalisation. La mise en culture de ce prélèvement permet d'isoler des germes pour lesquels le patient était connu colonisé : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Le milieu *cepacia* (Oxoid) permet de mettre en évidence une primo colonisation à *Burkholderia cepacia* à 10,2 UFC/mL et à *Pandoraea pnomenus* à 10,5 UFC/mL. Toutes les identifications ont été réalisées par spectrométrie de masse Microflex (Bruker). Le patient présente une amélioration clinique sous traitement avec une diminution de la toux associée à une prise de poids. Cependant, les ECBC de contrôle à J2 puis J6 demeurent positifs à *P. pnomenus* et à *S. aureus*. La souche isolée présente une

sensibilité à l'imipénem, la lévofloxacine, au cotrimoxazole et à la minocycline et une résistance à la témocilline, cef-tazidime, céfépime, ceftolozane-tazobactam, tigécycline et ciprofloxacine. En l'absence de recommandations spécifiques à *Pandoraea*, les diamètres d'inhibition et les CMI ont été interprétés selon les recommandations en vigueur pour *Burkholderia* lorsqu'elles existaient ou selon les concentrations critiques PK-PD du CASFM 2019 v2.0. Une quadrithérapie par ceftazidime, tobramycine, lévofloxacine et cotrimoxazole a été introduite à J8 afin de maintenir une bithérapie sur chaque type de germe, permettant une négativation complète des prélèvements à partir de J19.

Discussion

Décrit en 2000, *Pandoraea* est un bacille à Gram négatif non fermentant de l'environnement. Il est proche des *Burkholderia* et *Ralstonia*, connus pour leurs rôles dans les exacerbations pulmonaires et le déclin des fonctions respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. L'isolement de *Pandoraea* est beaucoup plus rare et son identification précise a été améliorée depuis l'utilisation de la spectrométrie de masse en microbiologie médicale. L'Observatoire national des *Burkholderia* recense en moyenne 5 cas par an d'infection à *Pandoraea*, principalement *P. sputorum* et à notre connaissance il s'agit du premier cas français d'isolement de *P. pnomensusa* chez un patient atteint de mucoviscidose. Seuls deux cas ont été décrits dans la littérature et l'isolement de ce germe semblait associé à un pronostic péjoratif. Cependant, le rôle pathogène de *Pandoraea* reste méconnu compte tenu du faible nombre de cas. Les praticiens impliqués dans le diagnostic et le traitement des patients atteints de mucoviscidose doivent connaître son importance clinique, en effet, comme *Burkholderia*, une colonisation chronique à *Pandoraea* correspond à un tournant majeur dans l'évolution des patients atteints de mucoviscidose.

Difficulté dans l'interprétation d'une intoxication au cyanure, toujours d'actualité : ... à propos d'un cas

Céline Mory¹, Adeline Knapp¹, Charlotte Mayer-Duverneuil¹, Jean Claude Alvarez^{1,2}

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

La contribution de la toxicologie analytique dans le diagnostic d'intoxication au cyanure (CN) est perturbée par

l'interprétation délicate voire infructueuse des concentrations sanguines chez le patient vivant ou en post-mortem, notamment après administration d'antidote. Nous rapportons ici un cas de décès après prise en charge médicale hospitalière par ingestion de sels de CN documenté par des prélèvements sanguins ante-mortem et post-mortem. Un homme de 34 ans est découvert en arrêt cardio-respiratoire avec vomissements abondants et sanguinolents après ingestion supposée d'un flacon de 100 mL de réactif alcalin à base de NaCN utilisé pour le titrage du manganèse. Le flacon retrouvé sur les lieux a incité le Samu à administrer rapidement une dose de 5 g d'hydroxocobalamine (Cyanokit®), l'antidote de l'intoxication au CN, permettant de récupérer rapidement une activité cardiaque spontanée. À l'arrivée aux urgences, on observe un érythème cutané généralisé associé au liquide lacrymal rouge vif dû à l'injection de Cyanokit®, une alcoolémie à 2,1 g/L avec reste du bilan toxicologique négatif. Le bilan biologique révèle une acidose lactique sévère (lactates à 16 mM) et certaines analyses sont perturbées par la coloration rouge vif de l'hydroxocobalamine. L'évolution est rapidement défavorable conduisant au décès 7 h après son admission, malgré une seconde dose de Cyanokit®. Le rapport d'autopsie révèle une mort toxique par ingestion de produits à l'origine d'une altération de la muqueuse gastro-oesophagienne témoignant de lésions caustiques typiques des produits alcalins associé à un syndrome asphyxique et une coloration anormale des viscères. L'analyse du produit montre une concentration de 35 g/L de CN, correspondant à une dose supposée ingérée de 3,5 g (dose létale : 0,1 à 0,2 g). Les prélèvements suivants sont analysés par LC-MS/MS après dérivation du CN : 1 échantillon ante-mortem (1) 4h après intoxication et 2h après injection de Cyanokit® et 2 échantillons post-mortem (2) 10 min après le décès et 8h après injection de Cyanokit® ; (3) lors de l'autopsie, 6j après le décès. Les concentrations en CN (CCN) sont : (1) CCN = 5,8 µg/mL ; (2) CCN = 0,26 µg/mL ; (3) CCN = 0,075 µg/mL. L'interprétation diffère selon les prélèvements : (1) CCN considérée comme létale (2) CCN légèrement supérieure aux CCN physiologiques (3) CCN considérée comme physiologique (< 0,2 µg/mL) pouvant écarter à tort une intoxication au CN en l'absence de contexte. L'hydroxocobalamine est responsable d'une diminution de la CCN après formation de cyanocobalamine, complexe non toxique éliminé par le rein. Cette diminution semble se poursuivre en post-mortem. Cependant, le CN a provoqué des dommages mitochondriaux cellulaires irréversibles alors qu'il a totalement disparu du sang. L'administration d'antidote, les problèmes de stabilité et les difficultés analytiques rendent délicate l'interprétation des résultats et doivent être pris en compte lors de suspicions d'intoxication au CN.

Efficacité d'un traitement par anticoagulant oral direct et immunoglobulines intraveineuses dans un cas complexe de thrombopénie induite ... à l'héparine immuno-allergique résistante aux traitements usuels

Eve-Marie Walle¹, Olivier Chassin², Nicolas Legris², Noémie Chanson³, Bernard Jondeau¹, Andreas Perrier-Cornet¹, Cécile Lavenu-Bombed¹, Sophie Combe¹, Véronique Picard¹, Safa Sanekli¹, Valérie Proulle¹

1 Service d'hématologie biologique, 2 Service de neurologie adultes, 3 Service de médecine interne, CHU Bicêtre, HUPS, AP-HP, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

Nous présentons le cas d'une thrombopénie induite à l'héparine immuno-allergique (TIH) dont la prise en charge a nécessité le relais du danaparoïde sodique (DS) par un anticoagulant oral direct (AOD) et l'administration d'immunoglobulines intraveineuses (IGIV). Le patient est un homme de 71 ans polyvasculaire (HTA, diabète, coronaropathie, artériopathie). Il est traité par antibiotiques pour un érysipèle du membre inférieur (MI), mais est hospitalisé 8 jours après pour aggravation clinique. Une thrombose veineuse profonde des MI (TVP) est éliminée et une anticoagulation préventive par héparine (enoxaparine sodique, HBPM) débutée. A J7 du traitement par HBPM, le patient présente une hémiparésie gauche, reliée à une ischémie cérébrale carotidienne objectivée sur l'IRM, et une chute brutale des plaquettes (74 à 20 G/L). L'association d'une diminution de plus de 50 % du chiffre de plaquettes et d'une thrombose aiguë à J7 d'un traitement par HBPM suggère une TIH (score de 4T = 6) confirmée par la détection d'anticorps anti-PF4 par test Elisa. Le traitement par HBPM est arrêté et relayé par le DS (recommandations GIHP/GFHT 2019), mais à doses préventives malgré la thrombose aiguë, associée à des transfusions plaquettaires et une supplémentation en fibrinogène. Il est alors transféré dans notre hôpital. A l'arrivée, il présente une thrombopénie (49 G/L), un TP à 59 %, un fibrinogène à 1,4 g/L et des D-dimères > 4 000 ng/mL. Le DS est administré à doses curatives. Mais le tableau thrombotique s'aggrave avec apparition de nouvelles lésions ischémiques cérébrales à l'IRM. A J12, devant l'extension de la thrombose cérébrale et la persistance de la thrombopénie associée à des D-dimères élevés, une TIH par réaction croisée au DS et une cause autre de CIVD (septique) sont évoquées. Le DS est relayé par un AOD, le dabigatran, comme suggéré dans la littérature (Theodore, 2017). Le diagnostic de TIH croisée est éliminé par la négativité du test spécifique de relargage à la sérotonine marquée. A l'inverse, un sepsis sur angiocholite aiguë est diagnostiqué et l'antibiothérapie

probabiliste instaurée est efficace en 48 h. Le traitement par AOD est maintenu, mais la thrombopénie persiste (16 G/L). À J5 du traitement curatif par AOD, malgré des transfusions plaquettaires, survient un épisode de rectorragie nécessitant une transfusion érythrocytaire. Un traitement par IGIV est débuté, comme proposé dans la littérature (Greinacher, 2017) pour certaines TIH auto-immunes, qui permet une ascension rapide du chiffre de plaquettes en 48 h (66 puis 163 G/L). En raison d'une TVP du MI découverte à l'échographie doppler, le traitement par AOD est maintenu sans complication pendant 3 mois.

En conclusion, notre patient a présenté une thrombopénie due à une TIH associée à une CIVD et un sepsis. La correction de la thrombopénie a nécessité l'utilisation d'IGIV. Les AOD ont été utilisés avec succès pour l'anticoagulation soulignant leur utilité dans la prise en charge de certaines TIH.

Une protozoose américaine mal connue

Lorra Monpierre^{1}, Olivier Voisin², Gabriel Macheda³, Alban Le Monnier⁴, Benoît Pilmis³, Assaf Mizrahi⁴, Yaye Senghor¹*

*Lauréat du Prix SFBC

1 Service de microbiologie clinique, 2 Service de médecine interne, 3 Équipes mobiles de microbiologie clinique, 4 Service de microbiologie clinique, Groupe hospitalier Paris-Saint-Joseph, Paris, France ; EA4043 Unité bactéries pathogènes et santé, Université Paris-Sud Saclay, Châtenay-Malabry, France

La babésiose est une zoonose cosmopolite émergente causée par un protozoaire intra-érythrocytaire du genre *Babesia* dont la transmission est principalement médiée par des tiques. Plusieurs espèces de *Babesia* sont responsables de la maladie chez l'homme, les principales étant *Babesia microti* en Amérique du Nord, *B. divergens* et *B. venatorum* en Europe. La présentation clinique de la maladie varie d'une infection asymptomatique à un tableau d'infection sévère pouvant engager le pronostic vital.

Nous rapportons ici le cas d'un patient français, vivant dans le Nord Est des Etats-Unis depuis 19 ans. Il consulte dans le service d'accueil des urgences en juin 2019 pour fièvre à 38,4 °C, asthénie, anorexie évoluant depuis 5 jours. À son arrivée, le bilan biologique objectivait une bicytopenie avec une anémie normocytaire à 8,6 g/dL associée à une thrombopénie à 34 000/mm³. Le bilan sanguin révélait également un syndrome inflammatoire biologique avec une CRP à 270 mg/L, une cytolysé hépatique avec ASAT à 94 UI/L et ALAT 53 UI/L, une cholestase très modérée avec un ictère (bilirubine totale 42 µmol/L, bilirubine

conjuguée 19 $\mu\text{mol/L}$). Devant la bicytopenie observée, un frottis sanguin réalisé en hématologie révélait la présence d'éléments intra-érythrocytaires évocateurs de Plasmodium alors que l'amplification génique du genre Plasmodium (LAMP PCR) était négative.

À l'interrogatoire, aucune notion de voyage récent en zone impaludée n'a été retrouvée, remettant donc en question le diagnostic de paludisme. Les derniers voyages remontaient à 2004 au Japon, en Australie et en Inde sans notion d'antécédent de paludisme. Le diagnostic de babésiose est alors évoqué puis confirmé par l'analyse microbiologique du frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa et la PCR d'espèce en faveur de *B. microti*. La parasitémie était élevée à 7 %. On notait particulièrement des érythrocytes polyparasités par des trophozoïtes piriformes, en tétrades ou vacuolés.

Un traitement par azithromycine 500 mg/jour et atovaquone 750 mg matin et soir per os a été instauré avec une amélioration clinique et biologique rapide. Le patient était strictement apyrétique 24 heures après l'introduction du traitement. Le bilan biologique 48 heures après le début du traitement, montrait une parasitémie négative, une nette régression du syndrome inflammatoire (CRP 90 mg/L) alors que l'anémie était plus marquée avec une hémoglobine à 6,8 g/dL. La babésiose est un diagnostic différentiel du paludisme qu'il faut évoquer chez tout patient présentant une fièvre inexplicable sans notion de séjour en zone impaludée et ayant fréquenté dans les deux mois précédents un pays d'endémie durant la période d'activité des tiques au printemps ou à l'automne. D'un point de vue microbiologique, la présence d'un polyparasitisme des érythrocytes par des trophozoïtes piriformes, en tétrades ou vacuolés est fortement évocatrice de la babésiose. Le diagnostic microscopique doit être confirmé par PCR pour le diagnostic d'espèce.

Session « Biologie hospitalière »

Deux années d'utilisation de la PCR grippe/VRS aux urgences : retour d'expérience

Inès Rezzoug, Marlène Amara, Anne Gaëlle Cauchie, Amandine Hen, Stéphanie Marquet Juillet

Service de biologie, Centre hospitalier André Mignot de Versailles, Le Chesnay, France

La grippe touche chaque année entre 2 et 8 millions de personnes en France. En période épidémique, les structures hospitalières ont besoin d'avoir un diagnostic rapide et fiable afin d'orienter les patients dans les lits d'aval

et de désengorger le service des urgences. Ce diagnostic est particulièrement important dans les hôpitaux disposant majoritairement de chambres doubles. Ainsi, la délocalisation d'un automate de PCR grippe en période épidémique dans le service des urgences, après avoir mis en place des accords clinico-biologiques permettant de définir les conditions de réalisation du test, peut apporter une solution appropriée. L'objectif de notre étude est d'étudier l'impact de la mise en place d'un tel test.

Matériel et méthode

Etude rétrospective de deux saisons épidémiques sur l'appareil GeneXpert® (Cepheid) aux urgences.

Analyse de plusieurs paramètres :

- respect des indications définies dans les accords clinico-biologiques, à savoir : 1) PCR réalisée uniquement chez les patients dont la décision d'hospitalisation est déjà prise chez l'adulte ; 2) PCR réalisée uniquement si le résultat de cette dernière modifie la prise en charge chez l'enfant ;
 - délai moyen entre l'admission aux urgences et le rendu de la PCR en fonction de la période de réalisation du test.
- Nous avons étudié les dossiers de tous les patients ayant eu une PCR grippe aux urgences sur cette période.

Résultats

Au total, 2 241 dossiers ont été étudiés. La mise en place de la PCR grippe en biologie délocalisée a permis de diminuer le délai de rendu de la PCR grippe avec un délai moyen de rendu de 6,3 h vs 4 à 72 h pour les prélèvements envoyés au laboratoire (virologie fermée la nuit, le WE, et les jours fériés) ; 42 % des tests ont été réalisés en période de garde de week-end, parmi lesquels 69 % ont été rendus dans un délai inférieur à 5 h. Le délai de rendu des résultats en biologie délocalisée n'était pas influencé par le nombre de tests réalisés. Le nombre de prescriptions conformes aux accords clinico-biologiques chez l'adulte était de 84 % la première année et de 83 % la deuxième, sans différence entre les périodes ouvrables et les périodes de garde de week-end. En pédiatrie, le respect des indications était plus faible que chez l'adulte (58,6 et 65 %).

Conclusion

La biologie délocalisée, nouvelle en microbiologie, présente un certain nombre de contraintes pour le biologiste (répondre à la norme 22870, formations des utilisateurs...). Néanmoins, les bénéfices apportés par la réalisation d'une PCR grippe au sein du service des urgences sont majeurs. En période d'épidémie de grippe, l'obtention d'un résultat rapide et fiable permet de faciliter la gestion des lits d'aval et donc de fluidifier les transferts et les hospitalisations de patients. Toutefois le contrôle et le suivi par le biologiste de ces tests coûteux sont indispensables pour éviter une dérive de leur utilisation.

Suivi du traitement de l'hémophilie A : un dosage spécifique de l'activité du facteur VIII Ionoctocog alfa faisant face aux limites des techniques de dosage traditionnelles

Floriane Devaux, Sara Zia-chahabi, Claire Flaujac

Laboratoire d'hématologie biologique, Service de biologie médicale, Centre hospitalier de Versailles André-Mignot, Le Chesnay, France

L'Afstyla®, Ionoctocog alfa, est un facteur VIII (FVIII) recombinant humain de longue durée d'action utilisé dans le traitement de l'hémophilie A. Contrairement à d'autres produits, il n'y a pas d'ajout de macromolécules, il est constitué d'une chaîne unique avec un domaine B tronqué qui améliore sa stabilité. Pour son suivi, le fournisseur recommande une méthode chromogénique, difficilement applicable 24h/24, ou une méthode chromométrique en appliquant un facteur multiplicatif de 2, lié à une sous-estimation de l'ordre de 45 %. L'utilisation d'une méthode chromométrique classique nécessite une comparaison préalable avec la méthode chromogénique et une vigilance lors de l'interprétation des résultats par les cliniciens devant appliquer le facteur multiplicatif. Cette étude a pour objectif d'évaluer la mise en place d'une méthode chromométrique, sans nécessité d'appliquer un facteur de conversion, grâce à une calibration spécifique du FVIII Afstyla®, permettant une disponibilité du dosage 24h/24 avec nos réactifs habituels.

La calibration a été établie à partir d'Afstyla® reconstitué selon les recommandations fournisseur, puis dilué dans un plasma déficient en FVIII (concentration FVIII 1 UI/mL). Le plasma calibrant a été contrôlé par technique chromométrique, en tenant compte du facteur multiplicatif. La configuration du test (FVIII CKPA) sur l'automate Star Max® (Stago) est une courbe polynomiale d'ordre 2, identique à celle habituellement utilisée. Les dosages de FVIII ont été réalisés par technique chromométrique (CK-Prest®, Stago (FVIII CKP)) ou par technique chromogénique Tri-CHROM Factor VIII:C (Tcoag). La calibration FVIII CKPA obtenue est conforme à celle attendue avec le CKP. Les études de répétabilité et de reproductibilité ont été réalisées à partir de contrôles internes de qualité habituels : normal, pathologique, très pathologique et retrouve des coefficients de variation respectifs de répétabilité (n = 10) de 1,24 %, 1,32 % et 2,96 %, et de reproductibilité (n = 12) de 6,2 %, 4,0 % et 7,7 %. Ces résultats sont conformes aux critères acceptables du GFHT. La stabilité des réactifs à bord a été évaluée jusqu'à 5h après reconstitution. Le FVIII Afstyla® reconstitué en eau est peu stable et passe de 120 % à 103 % en 1h alors que le calibrant est stable jusqu'à 5 heures après reconstitution en plasma déficient FVIII. La linéarité a été vérifiée à partir de plasmas chargés

en FVIII Afstyla® de 120 % à < 1 % (R² = 1). La méthode a été vérifiée avec le plasma d'hémophile A sévère traité par Afstyla®. Le FVIII par technique chromogénique (80 %) est comparable au FVIII CKPA (77 %), 2 fois plus élevée que le FVIII CKP (37 %). La réalisation de la courbe de calibration dédiée Afstyla® est satisfaisante et peut constituer, dans la limite du coût du médicament utilisé pour la calibration, une alternative pour les laboratoires ne disposant pas de technique chromogénique et/ou souhaitant disposer d'un dosage 24h/24 avec leurs réactifs de dosage chromométrique habituels.

Validation d'une méthode de dosage simultané de l'imipénème, l'ertapénème et le méropénème dans le plasma humain par chromatographie liquide haute performance

Amandine Caillault, Gaëlle Noé, Sybille Ghacham, Valérie Furlan

UF pharmacologie-toxicologie, Service de biochimie-pharmacologie-toxicologie, Hôpital de Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France

Les carbapénèmes sont des bêta-lactamines à large spectre, de plus en plus utilisés en raison de l'émergence de bactéries résistantes, et utilisés dans le traitement probabiliste des infections sévères. La variabilité inter- et intra-individuelle de leurs paramètres pharmacocinétiques, conduisant à un risque de toxicité ou d'inefficacité, justifie leur suivi thérapeutique. La mise au point du dosage plasmatique des carbapénèmes permet de mesurer les concentrations résiduelles et maximales nécessaires à leur adaptation posologique. Une méthode de chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec détection UV a été développée et validée selon les critères du Cofrac.

Matériels et méthodes

Le dosage est réalisé sur une chaîne CLHP Ultimate 3000, avec détection à 298 nm, une colonne C18 et un gradient d'élution de tampon phosphate Na₂HPO₄ et de méthanol. Une gamme plasmatique (0-100 mg/L) stabilisée dans l'acide 3-morpholino-1-propanesulfonique (MOPS) et 3 contrôles de qualité (6-30-75 mg/L) ont été préparés. Le prétraitement consiste en une précipitation du plasma stabilisé contenant l'étalon interne (ceftazidime) avec de l'acétonitrile. Après centrifugation, on réalise une évaporation sous azote et une reprise dans le MOPS, 50 µL sont injectés. La validation de méthode vérifie les critères suivants : rendement d'extraction, spécificité, linéarité, répétabilité, fidélité intermédiaire, exactitude, justesse, interférence avec d'autres médicaments (n = 68) et les substances endogènes, contaminations inter-échantillon,

détermination de la limite de quantification (LOQ), vérification des différentes stabilités, et tests de comparaison inter-laboratoires.

Résultats et discussion

Les rendements d'extraction et les LOQ pour les 3 molécules sont respectivement $\geq 70\%$ et 0,5 mg/L, assurant une bonne sensibilité de la méthode pour les dosages en résiduel. La linéarité a été vérifiée jusque 100 mg/L, permettant de doser aisément les concentrations maximales. La répétabilité, la justesse, la fidélité intermédiaire et l'exactitude sont correctes (coefficients de variation CV $< 9\%$; biais $< 7\%$). Aucune interférence n'a été démontrée permettant le dosage chez des patients souvent polymédicamentés. Les conditions chromatographiques assurent une bonne sélectivité des 4 pics sur un run de 30 minutes, restant une limite de la méthode. Les stabilités diffèrent entre les carapénèmes excepté celle des 3 congélations/décongélations à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ permettant de redoser des échantillons si nécessaire. L'imipénème n'est stable que 24h à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, les 2 autres carapénèmes sont stables 4 jours à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et 24h à $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Conclusion

Cette méthode de dosage simultané de l'imipénème, ertapénème et méropénème en milieu plasmatique est simple, exacte, reproductible et spécifique. Elle constitue un outil important du suivi thérapeutique pharmacologique chez les patients atteints d'infections compliquées.

Mise au point au laboratoire du diagnostic de l'ataxie cérébelleuse autosomique dominante (ADCA) SCA36 : le gène NOP56 arrive au 5^e rang des gènes les plus fréquemment impliqués dans les ADCA

Marie Temple*, Jean-Madeleine De Saint-Agathe, Kathy Larcher, Sandrine Noel, Eric Le Guern, Cécile Cazeneuve

*Lauréat du Prix AAIPH

Département de génétique, UF de neurogénétique, GH Sorbonne Université, Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, France

Les ataxies cérébelleuses autosomiques dominantes (ADCA) constituent un ensemble hétérogène tant d'un point de vue clinique que génétique.

Les gènes ATXN1, ATXN2, ATXN3, CACNA1A, ATXN7, TBP et ATN1 sont les plus fréquemment impliqués. Cependant, au laboratoire de diagnostic, seuls environ 32 % des patients adressés pour une forme familiale d'ADCA portent une mutation (expansion de triplets CAG) dans un de ces gènes testés. Le gène NOP56 a été rapporté comme étant le

gène causal de l'ADCA SCA36. La mutation en cause est une grande expansion d'hexanucléotides GGCTG dans l'intron 1 du gène.

Nous avons mis au point le diagnostic de SCA36 au laboratoire avec deux techniques complémentaires : 1) une repeat-primed PCR (RP-PCR) pour la mise en évidence des grandes expansions et la limite de détection de la RP-PCR n'étant pas connue, 2) une PCR quantitative permettant de doser le nombre d'allèles de taille normale. Ces techniques ont été appliquées à une grande cohorte d'environ 400 patients adressés pour une forme familiale d'ADCA, pour lesquels la recherche au laboratoire de mutation des 7 gènes les plus fréquemment impliqués dans les ADCA s'était révélée négative.

Les résultats préliminaires portant sur environ 95 % des familles d'intérêt montrent qu'une grande expansion d'hexanucléotides du gène NOP56 est retrouvée dans 20 familles soit un nouveau diagnostic pour 32 patients. Cette fréquence place le gène NOP56 au 5^e rang des gènes les plus fréquemment impliqués dans les ADCA dans la population testée, après les gènes ATXN3, ATXN2, ATXN1 et ATXN7, respectivement au 1^{er}, 2^e, 3^e et 4^e rang avec 101, 62, 37 et 25 familles. Aucun signe clinique n'est spécifique de SCA36 dans les 20 familles identifiées ; cependant, une hypoacousie et, à un moindre degré, des fasciculations de la langue ou de la bouche semblent être plus fréquemment associées à SCA36 qu'aux autres SCA.

De façon surprenante, la présence d'une petite expansion associée en mosaïque à une grande expansion (GE) (nombre de répétitions > 650 répétitions) a été observée chez 3 patients indépendants. Dans l'une de ces familles, sont observés un patient porteur d'une petite expansion sans mosaïque (31 répétitions), une patiente, nièce du précédent, porteuse d'un allèle avec 23 répétitions associé en mosaïque avec une GE et plusieurs patients (dont deux sont de la même fratrie que la patiente précédente) porteur d'une GE. Ces observations apportent des éléments nouveaux dans la physiopathologie moléculaire de SCA36.

Compte tenu de la fréquence de la mutation du gène NOP56 dans ces familles atteintes d'ADCA, nous proposons d'inclure l'étude de ce gène dans la stratégie diagnostique des ADCA effectuée en routine au laboratoire.

Mise au point et applications diagnostiques d'une technique de flux métabolique de la bêta-oxydation mitochondriale des acides gras sur sang total

Edouard Le Guillou¹, Dimitri Schlemmer¹, Jean-François Benoist^{1,2}, Apolline Imbard^{1,2}

1 Laboratoire de biochimie-hormonologie, Centre hospitalo-universitaire Robert Debré, AP-HP, Paris,

France ; 2 Lip(Sys)2, Faculté de pharmacie, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

Les maladies héréditaires de la bêta-oxydation des acides gras résultent du déficit d'une enzyme ou d'un transporteur de cette voie métabolique. Le diagnostic repose sur l'association de signes cliniques (troubles hépatiques, myopathies) et biochimiques (hypoglycémie, anomalies du profil des acylcarnitines) et est confirmé par biologie moléculaire. Dans certains cas, le diagnostic reste difficile avec des présentations cliniques peu spécifiques, des profils biochimiques non informatifs car prélevés en dehors des épisodes aigus ou complexes à interpréter, et des variants génétiques de signification indéterminée. Des études fonctionnelles mesurant le flux intracellulaire de la bêta-oxydation sont apparues récemment. A partir d'une méthode développée par Dessein *et al.*, nous avons mis au point une technique rapide de mesure du flux métabolique de la bêta-oxydation, par quantification des acylcarnitines marquées produites dans les cellules sanguines des patients après incubation avec du palmitate marqué avec des isotopes stables.

Matériels et méthodes

Cent μ L de sang total sont incubés pendant 6h à 37 °C en présence de 200 nmol de d9-palmitate et 500 nmol de L-carnitine. Les réactions sont stoppées par congélation immédiate, les échantillons sont ensuite déprotéinisés, soniqués et centrifugés. Les acylcarnitines deutérées produites (de C2 à C16) sont dosées dans le surnageant par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), et quantifiées par dilution isotopique. Les résultats sont exprimés en nmol/G leucocytes et en rapport au témoin (%). Nous avons établi des valeurs de référence pour chaque acylcarnitine à partir de 43 sujets sains. Des patients avec déficits connus ont été testés : navette de la carnitine (CPT-II, n = 1), chaîne longue (VLCAD, n = 2), chaîne moyenne (MCAD, n = 2).

Résultats

Nous avons mis au point une technique LC-MS/MS et optimisé les conditions analytiques : temps d'incubation, extraction des acylcarnitines, concentration en substrat, choix d'étalons internes, durée de conservation pré-incubation. Cette technique permet de quantifier spécifiquement chaque acylcarnitine. Des rapports entre acylcarnitines permettent de sensibiliser le diagnostic. Nous retrouvons une augmentation de 8 100 % par rapport à la médiane des témoins du rapport C16/(Somme C2 à C14) en cas de déficit en CPT-II/translocase, de 2 600 % du rapport C14/(Somme C2 à C12) en cas de déficit en VLCAD et de 226 200 % du rapport C8/C4 en cas de déficit en MCAD.

Conclusion

Nous avons développé une technique de mesure in vitro du flux de la bêta-oxydation permettant de discriminer des patients atteints de déficit de la bêta-oxydation de sujets sains. Celle-ci a été mise en place en routine et a déjà permis de conclure sur certains cas difficiles. Cette technique constitue par ailleurs un outil important pour la validation fonctionnelle des variants identifiés par biologie moléculaire.

Session « Recherche clinique, fondamentale et translationnelle »

Caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'un anticorps anti-thrombine responsable d'un syndrome hémorragique sévère chez un patient atteint de gammopathie monoclonale d'origine indéterminée

Bérénice Schell, Thomas Brungs, Abla Amara, Céline Desconclois, Cécile Lavenu Bomblet, Cécile Goujard, Xavier Mariette, Valérie Proulle

Laboratoire d'hématologie biologique, CHU Paris-Sud - Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France

Les anticorps anti-thrombine (ATA) sont une cause rare de troubles acquis de la coagulation. Nous présentons la caractérisation *in vitro* et *in vivo* d'un ATA responsable d'un syndrome hémorragique sévère chez un patient atteint de gammopathie monoclonale d'origine indéterminée de type IgG κ .

In vitro, l'activité anti-thrombine (anti-IIa) du plasma pauvre en plaquettes (PPP) a été identifiée par les temps de céphaline activée (TCA) et temps de thrombine (TT). Le test de génération de thrombine (TGT) sur PPP a été effectué, mesurant le temps de latence (LT) et le potentiel de thrombine endogène (ETP), sur l'appareil CAT®, Stago. Les IgG anti-IIa ont été purifiées en chromatographie d'affinité par fixation sur α IIa humaine. Leur effet *in vivo* a été étudié sur la formation du thrombus dans un modèle murin de thrombose artérielle induite par laser : l'accumulation plaquettaire et la fibrino-formation au site de lésion ont été étudiées en microscopie intra-vitale avec des anticorps anti-plaquettes et anti-fibrine conjugués à des fluorochromes. *In vitro* le TCA et le TT du patient sont allongés à 76 s et > 120 s (contrôles 35 s et 18 s). Les résultats du dosage des facteurs de la coagulation sont normaux, aucun traitement anticoagulant n'est détecté. Le TT n'est pas corrigé par l'addition de PPP témoin, suggérant la présence d'un ATA. Le TGT effectué avec le PPP patient reste plat durant 1 h (LT > 1 h, ETP=0). Le TGT d'un mélange de dilutions croissantes

(1:1 à 1:32) de PPP patient avec un PPP contrôle objective un raccourcissement du LT (de 38 à 6 min) et une augmentation de l'ETP (251 à 575 nM/min) sans atteindre les valeurs obtenues avec le PPP témoin (4 min et 1 183 nM/min). Ceci confirme l'activité anti-coagulante du PPP du patient.

Comparé à l'ajout d'IgG contrôles dans un PPP témoin, l'ajout d'IgG anti-IIa purifiées à partir du plasma du patient entraîne un allongement du TCA à 59 s (vs 33 s) et du TT > 120 s (vs 19 s). Ces résultats montrent la responsabilité des IgG anti-IIa dans les anomalies plasmatiques. In vivo, dans le modèle murin de thrombose, comparée à l'injection intraveineuse d'IgG contrôles (1 mg), l'injection intraveineuse d'IgG anti-IIa purifiées (690 µg) entraîne une diminution d'au moins 70 % de l'accumulation plaquettaire et de la fibrinoformation au site de la lésion vasculaire, illustrant l'effet inhibiteur observé in vitro.

En conclusion, chez un patient présentant un syndrome hémorragique et une IgG κ monoclonale, nous avons mis en évidence in vitro une activité anti-IIa du plasma sur les tests spécifiques et globaux de l'hémostase. Nous avons montré que les IgG anti-IIa purifiées à partir du plasma du patient provoquaient, in vitro, un effet anti-coagulant et, in vivo, une inhibition de la formation du thrombus dans un modèle murin de thrombose. Ces résultats illustrent de manière unique l'imputabilité d'un ATA dans l'apparition d'un syndrome hémorragique chez un patient et la corrélation entre la clinique et la biologie, in vitro, ex vivo et in vivo.

Recherche de gènes modificateurs dans la neurofibromatose de type 1 par étude d'association génome entier

Laurence Pacot^{1,2*}, Audrey Sabbagh^{3*}, Béatrice Parfait^{1,2}, Anne Boland-Auge⁴, Delphine Bacq-Daian⁴, Ingrid Laurendeau², Salah Ferkal^{5,6}, Audrey Briand^{1,2}, Laurence Allanore⁵, Jean-François Deleuze⁴, Michel Vidaud^{1,2}, Dominique Vidaud^{1,2}, Réseau Nf-France, Pierre Wolkenstein^{5,6,7}, Éric Pasmant^{1,2}

*Contribution égale des auteurs

1 Service de génétique et biologie moléculaires, Hôpital Cochin, AP-HP, Centre Université de Paris, Paris, France ; 2 Inserm UMR_S1016, Institut Cochin, Université de Paris, Paris, France ; 3 UMR 261 MERIT, Institut de recherche pour le développement, Université de Paris, Paris, France ; 4 CEA, Centre national de recherche en génomique humaine, Evry, France ; 5 Département de dermatologie, Centre de référence des neurofibromatoses, Hôpital Henri-Mondor, AP-HP, Créteil, France ; 6 CIC1430, Hôpital

Henri-Mondor, AP-HP, Créteil, France ; 7 EA7379, Université Paris-Est-Créteil, Créteil, France

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie génétique caractérisée par le développement de tumeurs bénignes des gaines nerveuses appelés neurofibromes, qui peuvent se transformer en cancers appelés MPNST (*malignant peripheral nerve sheath tumors*). Ces MPNST sont la première cause de mortalité chez les patients atteints de NF1. Transmise sur un mode autosomique dominant, la NF1 est causée par la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur NF1 dans les cellules de Schwann. Ce gène code la neurofibromine, régulateur négatif de la voie RAS-MAPK. Malgré une pénétrance complète à l'âge de 8 ans, l'expressivité de la maladie est extrêmement variable, y compris au sein d'une même famille. De rares variants faux-sens du gène NF1 ont pu être corrélés à des formes plus ou moins sévères de NF1, mais la plus grande part de la variabilité phénotypique de cette maladie reste inexplicée à ce jour. L'étude de modèles animaux et de corrélations phénotypiques intrafamiliales a suggéré l'existence de gènes modificateurs dans la NF1. Nous présentons ici les résultats de la première étude d'association génome entier pour la NF1, réalisée en collaboration avec le réseau NF-France. Ce travail a reposé sur l'étude génotypique et phénotypique de plus de 1 500 patients atteints de NF1 issus de 3 programmes hospitaliers de recherche clinique entre 2003 et 2013. Seuls les patients porteurs de variants pathogènes du gène NF1 pour lesquels aucune corrélation n'a été précédemment établie ont été retenus et génotypés. Après un contrôle de qualité des données, une cohorte de 1 333 patients a été obtenue et subdivisée en 2 échantillons de 918 (échantillon de découverte, ED) et 415 patients (échantillon de réplique, ER). Notre étude s'est focalisée sur 3 phénotypes majeurs dans la NF1 : les neurofibromes cutanés, sous-cutanés et plexiformes. L'analyse des données montre que le seuil de signification statistique à l'échelle du génome ($p < 5.10^{-8}$) est franchi dans l'ED pour le trait des neurofibromes plexiformes. Par ailleurs, bien qu'inférieurs au seuil pangénomique, d'autres signaux significatifs sont observés dans les différents phénotypes étudiés, avec un total de 10 régions génomiques répliquées ($p < 10^{-5}$) et de 22 régions significatives non répliquées ($p < 10^{-6}$) observées pour l'ensemble des 3 traits étudiés. Ces régions pointent l'implication potentielle respectivement de 83 et 270 gènes, dont 40 et 116 gènes codants. Parmi eux, plusieurs sont impliqués ou en lien avec la voie RAS-MAPK (WDR48, MAP3K7, MMD2, TBK1, RAP2A), le cycle cellulaire (DAPK1, GAS1, FYN, MYCL) ou le processus de myélinisation (FRMD4A, FYN).

Notre étude permet de confirmer l'implication de gènes précédemment identifiés et révèle plusieurs gènes modi-

ificateurs potentiels dans la NF1. Des régions génomiques à risque distinctes entre les trois phénotypes étudiés sont mises en évidence, suggérant l'existence de mécanismes physiopathologiques spécifiques à l'origine de chaque type de neurofibromes.

Intérêt de l'évaluation de la réponse immunitaire spécifique anti-cytomégalovirus (CMV) par le test QuantiFERON®-CMV dans la prise en charge des patients transplantés rénaux

Clémentine Moulin, Claire Deback, Séverine Beaudreuil, Hugo Roux, Salima Hachein-Bey-Abina, Aude Gleizes*

* Lauréat du Prix du SIPHIF

Laboratoire d'immunologie, CHU Paris-Sud - Hôpital de Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre, France

L'infection à CMV, complication infectieuse la plus fréquente du traitement immunosuppresseur des receveurs d'organes, est responsable d'une forte morbidité et d'une augmentation du risque de rejet. Les traitements antiviraux ont des effets indésirables conduisant parfois à leur arrêt prématuré ou à l'émergence de résistances compliquant la prise en charge. L'immunité cellulaire médiée par les lymphocytes T CD8 (LT CD8) constitue le mécanisme majeur de défense anti-CMV. Le test QuantiFERON®-CMV (QTF-CMV) est une méthode Elisa qui permet l'analyse de la réponse immunitaire anti-CMV en mesurant la sécrétion d'IFN γ des LT CD8 effecteurs mémoires après leur stimulation par des peptides viraux.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'apport du QTF-CMV pour détecter la présence d'une immunité T spécifique protectrice afin d'optimiser la prise en charge thérapeutique des patients transplantés rénaux. Au total, 63 patients greffés rénaux ont été inclus constituant 3 groupes de risque CMV définis selon le statut sérologique CMV : 6 D-/R- (risque faible) ; 22 D-/R+ et 17 D+/R+ (risque modéré) ; 18 D+/R- (haut risque). Le QTF-CMV a été réalisé au cours du suivi post-greffe et pour 25 d'entre eux avant transplantation (J0). Les tests sont réalisés et interprétés selon les recommandations du fabricant : négatif (pas d'immunité anti-CMV), positif (immunité anti-CMV), indéterminé (non interprétable). Les charges virales (CV), renseignements cliniques et traitements antiviraux ont été colligés.

Nous montrons qu'il existe une bonne corrélation entre le QTF-CMV et le statut sérologique puisqu'à J0, tous les patients R- ont un QTF-CMV négatif et sur les 15 patients R+, 12 ont un QTF-CMV positif, soit 88 % de concordance. Trois patients R+ ont par contre une immunité cellulaire anti-CMV altérée (QTF-CMV négatif), ce

qui est cohérent avec la littérature et témoigne d'un risque majoré d'infection post-greffe.

Parmi les 7 patients ayant eu une infection à CMV, 2 avaient un QTF-CMV indéterminé, 3 négatif et 2 positif. Le risque infectieux semble donc plus fréquent en l'absence d'immunité anti-CMV. L'intérêt du monitoring par le QTF-CMV sur la stratégie de prise en charge est mis en évidence par 2 exemples : un patient D+/R- sous prophylaxie CMV, présentant un QTF-CMV négatif à un mois de la greffe et une CV indétectable, chez lequel le virus réplique 4 mois plus tard. La réponse anti-CMV testée plusieurs fois négative ne permet pas de contrôler l'infection malgré plusieurs lignes de traitement anti-CMV. A contrario, un patient D+/R+ ayant une forte réponse T anti-CMV à 11 mois de la greffe conserve un contrôle de la répllication virale malgré l'arrêt de la prophylaxie depuis 4 mois.

En conclusion, le QTF-CMV permet de compléter les données du statut sérologique pour une meilleure stratification des patients à risque. De plus, ce test pourrait aider en post-transplantation à optimiser la prise en charge thérapeutique en améliorant l'évaluation du risque de répllication virale.

Dysfonctions mitochondriales dans les macrophages spumeux induites par la surcharge en LDL-cholestérol

Edouard Le Guillou^{1,2}, Pierre-Hadrien Becker^{1,2}, Patrice Thérond^{1,2}, Pauline Gaignard^{1,2}*

*Lauréat du Prix Adebipharm

1 Unité universitaire interdisciplinaire Lip (Sys)², Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France ; 2 Service de biochimie, CHU Bicêtre, AP-HP, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France

Le métabolisme mitochondrial constitue une nouvelle voie de recherche prometteuse dans la physiopathologie de l'athérosclérose : en effet, il a été montré dans certains modèles cellulaires que la surcharge en cholestérol altère le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), principale source d'ATP ; or, l'efflux du cholestérol des macrophages spumeux est majoritairement ATP-dépendant. Notre hypothèse est donc que la surcharge en LDL-cholestérol altérerait le fonctionnement mitochondrial des macrophages.

Matériels et méthodes

Des macrophages humains THP-1 ont été surchargés ou non par des LDL acétylées (LDLac, modèle de lésion précoce d'athérosclérose) ou oxydées (LDLox, modèle de lésion tardive). Les concentrations de glucose et lactate dans le milieu de culture ont été mesurées après 48h de surcharge.

Une analyse en cinétique du stress oxydant mitochondrial a été réalisée par mesure du glutathion cellulaire et mitochondrial par spectrométrie de masse et de la production d'anions superoxydes par fluorimétrie à 4h, 24h et 48h de surcharge. L'activité de l'aconitase, une enzyme du cycle de Krebs inactivée par le stress oxydant, a été mesurée à 48h par spectrophotométrie (n = 6 séries). Un test Anova avec post-test de Tukey a été utilisé pour l'analyse statistique.

Résultats

Des travaux antérieurs de notre équipe ont montré que la surcharge pendant 48h en LDLac et LDLox diminue la consommation d'oxygène par la CRM par rapport aux cellules témoins et que cette diminution est plus marquée en présence de LDLox qu'en présence de LDLac. L'augmentation de la quantité de lactate produit par quantité de glucose consommée indique que le métabolisme majoritaire est de type glycolytique après surcharge en LDLox (augmentation de 49 % du ratio lactate produit/glucose consommé, $p < 0,001$ vs non surchargé). La production d'anions superoxydes n'est pas modifiée significativement par la surcharge au cours du temps. Cependant, l'augmentation de glutathion réduit dans la cellule dès 4h (+ 37 % en présence de LDLac, $p < 0,05$) et à 24h (+ 135 % LDLac $p < 0,01$; + 161 % LDLox, $p < 0,001$), ainsi que l'accumulation de glutathion oxydé dans la mitochondrie en présence de LDLox (+ 440 % à 24h, $p < 0,01$; + 470 % à 48h, $p < 0,001$) traduisent un état de stress oxydant, plus important en présence de LDLox que de LDLac. Il est observé en parallèle une diminution de l'activité de l'aconitase à 48h (- 26 % LDLac, $p < 0,001$; - 72 % LDLox, $p < 0,001$), très probablement par dommages oxydatifs.

Conclusion

Ces résultats montrent que la surcharge en LDL dans les macrophages induit un stress oxydant mitochondrial concomitant à la diminution de la consommation d'oxygène par la CRM. Ces dysfonctions mitochondriales sont plus marquées en présence de LDLox, modèle physiopathologique qui correspond à un état d'athérosclérose avancée. Ce travail se poursuit par l'analyse des effets sur la CRM des oxystérols, produits d'oxydation du cholestérol.

La réversion génétique dans la maladie de Fanconi, un modèle naturel de thérapie génique

Lise Larcher¹, Anna Raimbault², Nadia Vasquez², Mélanie Da Costa², Samuel Quentin³, Lucie Hernandez³, Catherine Dubois d'Enghien⁴, Marie Sébert³, Thierry Leblanc⁵, Dominique Stoppa-Lyonnet⁶, Régis Peffault de Latour⁷, Jean Soulier³

1 Inserm/CNRS U944/7212, Institut de recherche Saint-Louis, Université de Paris, France ; 2 Laboratoire d'hématologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France ; 3 Inserm/CNRS U944/7212, Institut de recherche Saint-Louis, Université de Paris & Laboratoire d'hématologie, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France ; 4 Service de génétique, Institut Curie Hôpital, Paris, France ; 5 Hematology Unit, Hôpital Robert Debré, AP-HP, Paris, France ; 6 DRUM Team, Inserm U830, Institut Curie, Paris, France & Service de génétique, Institut Curie Hôpital, Paris, France & Université de Paris, France ; 7 Centre de référence aplasies médullaires & Service d'hématologie-greffe de moelle, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France

La maladie de Fanconi (AF) est une maladie génétique récessive caractérisée par une fragilité chromosomique, l'apparition progressive d'une aplasie médullaire et une prédisposition aux cancers. A ce jour, 22 gènes FANC ont été impliqués dans l'AF. Typiquement, les patients AF développent une aplasie médullaire à un âge médian de 7 ans dont le seul traitement curatif était jusqu'à présent la greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT). Or l'HSCT est un traitement lourd aux effets indésirables graves et fréquents. Pour la première fois, des essais cliniques de thérapie génique (GT) ont montré des résultats précoces encourageants chez des patients AF (Río *et al.*, *Nat Med* 2019). Cependant, les patients AF ont un risque intrinsèque élevé de développer une leucémie aiguë myéloïde (LAM). Quid de ce risque chez les patients ayant une fraction de cellules hématopoïétiques génétiquement corrigées par GT et qui ne seront pas greffés ? Pour évaluer ce risque à moyen et long terme, nous avons étudié une situation naturelle qui survient spontanément dans une faible proportion de patients AF : la réversion somatique, ou mosaïcisme somatique hématopoïétique, due à l'acquisition d'un événement génétique conduisant à l'émergence de cellules spontanément corrigées. Cet événement rétablit la fonctionnalité du gène FANC et confère aux cellules porteuses une résistance aux agents génotoxiques et un avantage sélectif.

Nous avons sélectionné 13 patients, au sein d'une cohorte nationale de 335 patients AF, qui présentaient une normalisation d'un test fonctionnel au niveau sanguin. Nous avons re-séquéncé par NGS un panel de 62 gènes (FANCA, le gène le plus fréquemment muté dans l'AF + 61 gènes associés aux hémopathies myéloïdes) dans l'ADN extrait de cellules sanguines et comparé les données à celles du matériel constitutionnel (fibroblastes cutanés). Pour 12/13 patients, nous avons mis en évidence de façon certaine la réversion génétique qui se produisait le plus fréquemment par conversion génique. L'analyse des données cliniques montre qu'aucun des 13 patients n'a développé de LAM à

un âge médian de 25 ans [12-61]. Néanmoins, 4 (31 %) ont développé un cancer solide à un âge médian de 39 ans.

Ainsi, au sein de notre cohorte de patients révertants fonctionnels, nous avons pu identifier par une capture NGS la réversion génétique de FANCA, et montré la meilleure

évolution hématologique de ces patients. De façon importante, le mosaïcisme hématopoïétique semble protéger de l'apparition de LAM mais pas des cancers solides. Les données de suivi à moyen et long terme de ces patients révertants encouragent la mise en œuvre de la GT dans l'AF.