



**HAL**  
open science

# Étude de la qualité des concentrés plaquettaires d'aphérèse (CPA) dans le cadre de la validation d'un nouveau processus de séparation COBE spectra turbo

Christelle Corne

## ► To cite this version:

Christelle Corne. Étude de la qualité des concentrés plaquettaires d'aphérèse (CPA) dans le cadre de la validation d'un nouveau processus de séparation COBE spectra turbo. Sciences pharmaceutiques. 1999. dumas-01561127

**HAL Id: dumas-01561127**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01561127v1>**

Submitted on 12 Jul 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :  
[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>





1<sup>er</sup> exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 1999



N° 7035

**ETUDE DE LA QUALITE  
DES CONCENTRES PLAQUETTAIRES D'APHERESE (CPA)  
DANS LE CADRE DE LA VALIDATION  
D'UN NOUVEAU PROCESSUS DE SEPARATION  
COBE SPECTRA TURBO**

**MEMOIRE**  
**DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**  
Conformément aux dispositions du décret n°88-996  
du 19 octobre 1988, tient lieu de

**THESE**

Présenté à Grenoble

et soutenu publiquement le 30 juillet 1999

pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

par **Christelle VIEILLE épouse CORNE**

[Données à caractère personnel]

**JURY**

Président : Monsieur le Professeur A. FAVIER

Membres : Monsieur le Professeur J.C. BENSA

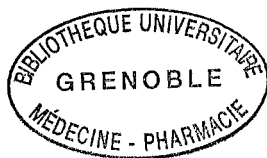
Madame le Professeur E. DAUBROSSE

Madame le Docteur M.C. JACOB

Monsieur le Docteur P. DRILLAT

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 1999



N°

**ETUDE DE LA QUALITE  
DES CONCENTRES PLAQUETTAIRES D'APHERESE (CPA)  
DANS LE CADRE DE LA VALIDATION  
D'UN NOUVEAU PROCESSUS DE SEPARATION  
COBE SPECTRA TURBO**

**MEMOIRE**  
**DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**  
Conformément aux dispositions du décret n°88-996  
du 19 octobre 1988, tient lieu de

**THESE**

Présenté à Grenoble

et soutenu publiquement le 30 juillet 1999

pour obtenir le grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

par **Christelle VIEILLE épouse CORNE**

*[Données à caractère personnel]*



**JURY**

Président : Monsieur le Professeur A. FAVIER

Membres : Monsieur le Professeur J.C. Bensa

Madame le Professeur E. DAUBROSSE

Madame le Docteur M.C. JACOB

Monsieur le Docteur P. DRILLAT

*A mes parents,*

*pour leur soutien et leur présence pendant ces longues années difficiles.*

*A mon mari,*

*cette thèse est également la sienne.*

*Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements :*

• à *Monsieur le Professeur Favier*  
*pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la Présidence de ce jury de thèse,*

• à *Monsieur le Professeur Bensa*  
*pour m'avoir accordé sa confiance et pour m'avoir accueillie au sein de*  
*l'Établissement de Transfusion Sanguine de Grenoble,*

• à *Madame le Professeur Daubrosse*  
*pour avoir accepté de représenter la faculté de Pharmacie de Besançon*  
*au sein de ce jury,*

• à *Monsieur le Docteur Drillat*  
*pour m'avoir initiée à la transfusion sanguine, pour sa disponibilité et*  
*son enthousiasme,*

• à *Madame le Docteur Jacob*  
*pour le temps qu'elle m'a consacré, pour sa rigueur et sa compétence.*

*Merci à l'ensemble du personnel de l'Établissement de Transfusion*  
*Sanguine qui a participé, de près ou de loin, au bon déroulement de ce*  
*protocole, et en particulier Christine Roesner pour sa patience*  
*exemplaire.*

*Merci enfin et surtout aux 40 donneurs de plaquettes, sans lesquels ce*  
*travail n'existerait pas.*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE  
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
ROCHAT	Jacques	Hygiène environnement Droit et Economie Pharmaceutiques
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>10</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>11</b>
<b>I Aphérèse</b> .....	<b>11</b>
I-1 Le don de plaquettes en aphérèse .....	11
I-2 Principale indication des concentrés plaquettaires .....	12
<b>II Physiologie plaquettaire</b> .....	<b>13</b>
II-1 Structure .....	13
II-1-1 Structure générale .....	13
II-1-2 Antigènes membranaires .....	13
II-1-2-1 Les glycoprotéines plaquettaires .....	13
II-1-2-2 Les phospholipides membranaires .....	14
II-1-3 Constituants intracellulaires .....	15
II-2 Métabolisme .....	17
II-3 Propriétés physiologiques : rôle dans l'hémostase .....	18
II-3-1 Adhérence .....	18
II-3-2 Activation .....	19
II-3-3 Changement de forme .....	19
II-3-4 Agrégation .....	19
II-3-5 Sécrétion .....	21
II-3-5-1 Expression de nouvelles molécules à la surface plaquettaire .....	21
II-3-5-2 Libération du contenu des granules .....	22
II-3-5-3 Cinétique .....	23
II-3-6 Flip-flop membranaire .....	23
II-3-7 Formation de micro-vésicules .....	24
II-4 Fonctions des plaquettes .....	24

<b>III Conservation des plaquettes dans les poches après aphérèse .....</b>	<b>25</b>
III-1 Modifications métaboliques du milieu .....	25
III-1-1 Métabolisme dans la poche plastique .....	25
III-1-2 Tests reflétant le métabolisme plaquettaire.....	26
III-1-2-1 pH.....	26
III-1-2-2 Indice de tournoiement.....	27
III-1-2-3 Glucose et lactate .....	27
III-1-2-4 Calcium .....	27
III-1-2-5 ATP .....	27
III-2 Activation plaquettaire .....	27
III-2-1 Stimuli d'activation dans les préparations de concentrés plaquettaires...	27
III-2-2 Détection des modifications morphologiques reflétant l'activation plaquettaire.....	29
III-2-2-1 Microscopie .....	29
III-2-2-2 Indice de tournoiement.....	29
III-2-2-3 Cytométrie de flux.....	30
III-2-3 Marqueurs membranaires d'activation .....	30
III-2-3-1 Le complexe GPIIb/IIIa (CD41/CD61).....	30
III-2-3-2 Le complexe GPIb/IX (CD42b/CD42a).....	32
III-2-3-3 La P-sélectine .....	32
III-2-3-4 LAMP .....	34
III-2-3-5 GPV .....	34
III-2-4 Facteurs solubles, marqueurs d'activation plaquettaire .....	35
III-2-4-1 $\beta$ TG et PF <sub>4</sub> .....	35
III-2-4-2 P-sélectine soluble.....	35
III-2-4-3 GPV .....	35
III-2-5 Tests fonctionnels .....	35
III-2-5-1 Etat réfractaire des plaquettes durant la conservation .....	35
III-2-5-2 Réponse au choc osmotique .....	36
III-3 Sénescence des plaquettes .....	37
III-3-1 Mortalité plaquettaire dans la poche .....	37
III-3-2 Evaluation <i>in vitro</i> de la mortalité plaquettaire.....	37
III-3-2-1 Mesure de la fixation de l'Annexine V .....	37
III-3-2-2 Détection des micro-particules.....	38
III-3-2-3 Mesure de substances relarguées après lyse des plaquettes .....	38
<b>IV Règles de conservation des plaquettes .....</b>	<b>39</b>
IV-1 Règles liées au prélèvement .....	39
IV-2 Règles liées à la conservation.....	39
IV-3 Règles du contrôle qualité .....	41

<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>43</b>
<b>I Exigences de l'Agence Française du Sang dans le cadre de l'évaluation d'un concentré plaquettaire déleucocyté</b>	<b>43</b>
<b>II Le système COBE Spectra LRS</b>	<b>44</b>
<b>III Donneurs</b>	<b>45</b>
<b>IV Obtention des plaquettes en vue de l'analyse biologique</b>	<b>46</b>
<b>V Activation plaquettaire mesurée par cytométrie de flux</b>	<b>48</b>
V-1 fixation cellulaire	48
V-2 marquage membranaire	48
V-3 cytométrie en flux	49
<b>VI Détermination du nombre de leucocytes résiduels</b>	<b>50</b>
VI-1 Cellule de Nageotte (technique de référence)	50
VI-2 CMF	50
<b>VII VPM et taux plaquettaire</b>	<b>51</b>
<b>VIII Dosages ELISA</b>	<b>51</b>
<b>IX Glucose et LDH</b>	<b>52</b>
<b>X Analyse statistique</b>	<b>52</b>
<b>RÉSULTATS</b>	<b>53</b>
<b>I Performances du séparateur</b>	<b>53</b>
I-1 Efficacité de collecte	53
I-2 Conséquences sur le taux plaquettaire	54
I-3 Caractéristiques des CPA	54
<b>II Étude de l'activation plaquettaire par CMF</b>	<b>54</b>
II-1 Mise au point pour la cytométrie de flux	54
II-1-1 Fenêtrage sur la population plaquettaire	54
II-1-2 Expression des résultats	55
II-1-3 Validation des réactifs	58
II-1-3-1 Mesure de la modification conformationnelle de la GPIIbIIIa	58
II-1-3-2 Mesure de la dégranulation alpha	58
II-1-3-2-1 Concernant la validation de l'anticorps	58
II-1-3-2-2 Optimisation des conditions opératoires	60



II-1-3-3	Mesure de la dégranulation lysosomale.....	65
II-1-3-4	Mesure de l'expression de la phosphatidylsérine .....	65
II-1-3-2-1	Optimisation des conditions opératoires.....	65
II-1-3-2-2	Modèles de stimulation in vitro .....	68
II-2	Résultats : activation plaquettaire dans les CPA (CMF) .....	70
II-2-1	CD62P .....	70
II-2-1-1	Description des profils.....	70
II-2-1-2	Activation après la procédure de séparation (J0).....	72
II-2-1-3	Activation au cours du temps .....	72
II-2-2	Annexine-V .....	74
<b>III</b>	<b>Etude de l'activation plaquettaire par dosage de facteurs solubles.....</b>	<b>79</b>
III-1	Préliminaires.....	79
III-2	Résultats pour les 60 CPA.....	79
III-3	Corrélations existant entre ces dosages de facteurs solubles et l'expression membranaire de CD62P.....	81
<b>IV</b>	<b>Tests morphologiques.....</b>	<b>86</b>
IV-1	Indice de tournoisement.....	86
IV-2	VPM.....	86
<b>V</b>	<b>Tests reflétant le métabolisme plaquettaire.....</b>	<b>86</b>
V-1	pH .....	86
V-2	glucose.....	86
<b>VI</b>	<b>Test reflétant la lyse des plaquettes : la LDH .....</b>	<b>87</b>
	<b>DISCUSSION</b>	<b>114</b>
	<b>CONCLUSION</b>	<b>128</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>129</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>137</b>

<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b>
--------------------------------

Figures et tableaux sont numérotés dans l'ordre de leur apparition dans le texte sur l'ensemble du document.

**LISTE DES FIGURES**

1	Répartition des phospholipides membranaires	p15
2	Principales caractéristiques ultra-structurales de la plaquette	p16
3	Voies métaboliques plaquettaires dans le plasma	p17
4	Structure schématique du complexe GPIIbIIIa	p20
5	Assemblage entre : thrombospondine, fibrinogène et GPIIbIIIa	p21
6	Voies métaboliques plaquettaires dans la poche	p25
7	Modifications antigéniques de surface accompagnant l'activation	p30
8	Liaison du fibrinogène à la plaquette	p31
9	Fibrinogène et PAC1 peuvent se lier à la GPIIbIIIa activée	p31
10	Dégranulation alpha	p32
11	Représentation schématique du CD63	p34
12	Schéma de l'anneau de séparation	p44
13	Différences entre la version 5.1 et la version Turbo	p45
14	Expression des résultats obtenus en CMF	p56
15	Standardisation de l'intensité de fluorescence : les billes calibrées	p57
16	Comparaison de deux anticorps anti-CD62P	p59
17	Courbe de saturation de l'anticorps anti-CD62P	p61
18	Expression du CD62P membranaire avec ADP ou PMA	p62
19	Influence de la fixation sur l'expression de CD62P membranaire	p63
20	Conservation des plaquettes de 4 donneurs dans le PF	p64
21a	Influence du délai avant l'analyse de plaquettes fixées et marquées	p66
21b	Influence du délai avant l'analyse de plaquettes fixées et marquées	p67
22	Influence de la durée de stimulation à l'ADP (Annexine V <sup>+</sup> )	p69
23	Exemples d'expression du CD62P membranaire	p71
24	Relation entre % CD62P et moyenne de fluorescence	p73
25	Informativité du CD62P à J0	p75

26	Répartition des fréquences concernant le % de plaquettes activées	p74
27	Exemple d'un marquage à l'Annexine V	p76
28	Courbes de régression CD62P et Annexine V	p78
29	Mode d'échantillonnage pour les dosages de facteurs solubles	p80
30	Résultats obtenus pour $\beta$ TG et GMP140	p79
31	Informativité des dosages de facteurs solubles à J0	p82
32	Corrélation entre les deux facteurs solubles	p83
33	CD62P membranaire et sécrétion de $\beta$ TG	p84
34	CD62P membranaire et sécrétion de GMP140	p85
35	Informativité du dosage de LDH à J0	p88
36-37-38	Représentations graphiques des moyennes obtenues pour tous les paramètres étudiés (comparaison des 2 versions)	p89-91

## LISTE DES TABLEAUX

*Remarques pour la lecture des tableaux de résultats*

- Pour faciliter la recherche d'un résultat, les valeurs obtenues sont classées par ordre croissant du code donneur.

- Les valeurs indiquées dans l'encadré "STUDENT" sont les valeurs de *p* obtenues en effectuant un test de Student pairé. La valeur est surlignée si elle est inférieure au seuil de 0,05 (risque alpha de 5 %).

I	Glycoprotéines principales de la plaquette	p14
II	Pourcentages de plaquettes activées au cours de la conservation	p33
III	Caractéristiques du CPA déleucocyté	p41
IV	Anticorps utilisés en CMF	p48
V	Caractéristiques des dosages ELISA	p51
VI	Chronologie des dosages ELISA	p51
VII	Liste complète des donneurs	p92
VIII	Paramètres hématologiques des donneurs avant et après la cytophérèse	p93
VIII bis	Taux plaquettaires des donneurs avant et après la cytophérèse	p94
IX	Performances du séparateur	p95
X	Caractéristiques des CPA obtenus	p96
XI	Leucocytes résiduels	p97
XII	Influence de la température de marquage pour l'Annexine-V	p68
XIII	Influence de la durée du marquage pour l'Annexine-V	p68
XIV	Pourcentage de plaquettes CD62P <sup>+</sup>	p98
XV	Moyenne géométrique de fluorescence totale (CD62P)	p99
XVI	Rapport des moyennes géométriques de fluorescence	p100
XVII	Pourcentage de plaquettes Annexine-V <sup>+</sup>	p101
XVIIIa	βTG	p102
XVIIIb	Rapport βTG/concentration plaquettaire	p103
XIXa	GMP140	p104
XIXb	Rapport GMP140/concentration plaquettaire	p105
XX	VPM	p106
XXI	Concentration plaquettaire	p107
XXII	Evolution du VPM de J0 à J3	p108
XXIII	Evolution du VPM de J3 à J5	p109

XXIV	pH	p110
XXV	Glucose	p111
XXVIa	LDH	p112
XXVIb	Rapport LDH/concentration plaquettaire	p113

<b>ABBREVIATIONS</b>
----------------------

ACD	acide citrique, citrate, dextrose
ADP	adénosine diphosphate
ATP	adénosine triphosphate
$\beta$ TG	bêta-thromboglobuline
CD	cluster of differentiation (antigène de différenciation)
CMF	cytométrie en flux
CMV	cytomégalo virus
CPA	concentré plaquettaire d'aphérèse
DAG	diacylglycérol
DMSO	diméthylsulfoxyde
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
GB	globule blanc
GMP	granule membrane protein
GP	glycoprotéine
HLA	human leucocyte antigen
HTLV	human T leukemia virus
Ig	immunoglobuline
IP <sub>3</sub>	inositol-3-phosphate
LAMP	protéine membranaire associée aux lysosomes
LDH	lactate déshydrogénase
LRS	leukoreduction system
PADGEM	platelet activation-dependant granule-external membrane
PBS	phosphate buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PDGF	platelet derived growth factor
PE	phosphatidyléthanolamine
PF	paraformaldéhyde
PF <sub>4</sub>	facteur plaquettaire 4
PG	prostaglandine
PI	phosphatidylinositol
PMA	phorbol myristate acétate
PS	phosphatidylsérine
PSL	produit sanguin labile
rpm	rotation par minute
SM	sphingomyéline
TSP	thrombospondine
TX	thromboxane
VPM	volume plaquettaire moyen
VST	volume sanguin total
vWF	facteur von Willebrand

## INTRODUCTION

Les concentrés plaquettaires sont indiqués comme traitements transfusionnels substitutifs face à un risque hémorragique. Il est possible d'isoler les plaquettes d'un donneur unique au moyen d'un séparateur de cellules : on obtient alors un concentré plaquettaire d'aphérèse (CPA).

Une machine d'aphérèse plaquettaire a été améliorée sur le plan technique par la société COBE. Il s'agit du séparateur Spectra. Ses nouvelles performances permettent un meilleur rendement de la collecte des plaquettes auprès du donneur.

Or, en France, les caractéristiques d'un nouveau produit sanguin labile doivent être évaluées par l'Agence Française du Sang qui autorise ensuite son utilisation.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail au sein de l'Etablissement de Transfusion Sanguine de Grenoble. Le but est de comparer les concentrés plaquettaires d'aphérèse issus de la machine existante (Spectra version 5.1) et de sa nouvelle version (Spectra version Turbo).

Il est connu que les concentrés plaquettaires se détériorent progressivement au cours du temps de conservation avec des modifications morphologiques, métaboliques et fonctionnelles. Nos critères d'analyse sont des paramètres biologiques mesurés *in vitro* exclusivement au cours de la conservation, à trois temps différents : les premier, troisième et cinquième jours après le prélèvement.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude de l'activation plaquettaire par deux approches : les dosages de molécules solubles consommées ou libérées par les plaquettes et la cytométrie en flux dans le but de détecter à la surface de la plaquette les antigènes caractérisant le statut d'activation.

*Revue de la littérature*



## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### I APHERESE

#### I-1 Le don de plaquettes en aphérèse

En transfusion, il existe deux types de concentrés plaquettaires : le concentré plaquettaire standard et le concentré plaquettaire d'aphérèse (CPA) qui diffèrent dans la façon dont ils sont prélevés et isolés à partir de donneurs.

♦ L'aphérèse est une méthode de séparation et de collecte des principaux composants du sang : érythrocytes, leucocytes, thrombocytes et plasma. Le sang veineux est prélevé auprès du donneur, anticoagulé, pompé dans la centrifugeuse et séparé en composants par centrifugation ; les éléments sont séparés suivant leur densité (densité des plaquettes = 1,040). Dans le cas particulier de la thrombaphérèse, ce sont les plaquettes qui sont prélevées et les autres composants sont réinjectés au donneur, soit par le même abord veineux (unipuncture), soit par un abord sur l'autre bras (bipuncture).

Cette technique concerne des donneurs âgés de 18 à 60 ans et jugés aptes médicalement. Cinq dons par an sont possibles, à 8 semaines d'intervalle minimum.

La logistique de ces dons nécessite leur conservation avant la transfusion. Les plaquettes obtenues sont conservées dans une poche stérile et apyrogène, en suspension dans du plasma autologue et un milieu anticoagulant. Le volume total de la suspension est compris entre 200 et 650 ml pour une quantité de plaquettes comprise entre  $2 \cdot 10^{11}$  et  $8 \cdot 10^{11}$ . Actuellement, les concentrés plaquettaires d'aphérèse sont conservables 5 jours.

♦ A titre de comparaison, le concentré plaquettaire standard a un volume de 50 à 60 ml. Son contenu minimal en plaquettes est de  $0,5 \cdot 10^{11}$ . Il provient de l'extraction *in vitro* de plaquettes contenues dans plusieurs dons de sang (deux centrifugations successives). Il n'y a pas d'étude démontrant que l'un des produits a plus de pouvoir hémostatique que l'autre.

Néanmoins, l'intérêt du mode de prélèvement en aphérèse est évident ; il permet de n'utiliser qu'un seul donneur à la place d'un pool, réduisant ainsi pour le receveur les risques d'immunisation anti-HLA et de transmission d'agents viraux. La préparation des CPA obéit donc à un double objectif : diminuer le risque transfusionnel par la diminution du nombre de donneurs et augmenter la qualité du produit par la purification de celui-ci (83).

Au sein de l'ETS Isère-Savoie, 3000 concentrés plaquettaires par an sont issus de la technique d'aphérèse.

## I-2 Principale indication des concentrés plaquettaires

Le concentré plaquettaire préparé par apherèse est un produit largement utilisé en médecine transfusionnelle. Il a pour but de pallier les effets d'une thrombopénie ou d'une thrombopathie.

Il est indiqué dans le cadre :

- du risque chirurgical (obstétrique, neurochirurgie, orthopédie, chirurgies cardiaque et hépatique)
- de l'onco-hématologie (hémopathies malignes et tumeurs solides)
- des aplasies médullaires, des syndromes myélodysplasiques et des thrombopénies constitutionnelles
- des thrombopénies périphériques (purpura, coagulation intravasculaire disséminée, hypersplénisme,...)

La posologie préconisée en première intention est de  $0,5 \cdot 10^{11}$  à  $1 \cdot 10^{11}$  plaquettes pour 10 kg de poids corporel.

♦ En cas de transfusion curative, l'efficacité de la transfusion est jugée sur l'arrêt des hémorragies. En 1998, une conférence de consensus précise que la transfusion est nécessaire si le taux plaquettaire est inférieur à  $50 \cdot 10^9/l$  mais il est clair que d'autres critères cliniques doivent être considérés (16). De plus, aucune étude ne permet de définir précisément la quantité de plaquettes à transfuser chez un patient à risque hémorragique lorsqu'une transfusion de plaquettes est indiquée.

♦ En cas de transfusion prophylactique, le seuil de  $10 \cdot 10^9$  plaquettes/l déclenche en général la procédure transfusionnelle chez des patients sans facteurs de risque associés (16). L'efficacité de la transfusion doit être jugée sur la recirculation des plaquettes transfusées. Elle est considérée comme efficace lorsque le rendement plaquettaire calculé à la 24<sup>e</sup> heure après la transfusion est supérieur à 0,2.

$$\text{Rendement transfusionnel plaquettaire} = \frac{(\text{NP avant} - \text{NP après}) \times \text{poids du patient (kg)} \times 0.075}{\text{Nombre de plaquettes transfusées (10}^{11}\text{)}}$$

NP : Numération plaquettaire

0.075 : facteur de conversion pour le calcul du volume sanguin total (75 ml/kg)

Le rendement transfusionnel plaquettaire varie entre 0 et 1.

Il a été montré récemment que le calcul de ce rendement 1 heure après la transfusion sous-estime le rendement réel si des plaquettes activées sont injectées (98) car il y a un phénomène de séquestration réversible par la rate et le foie (86). La recommandation est d'effectuer la mesure à 24 heures.

Un seul CPA choisi de façon appropriée permet d'assurer une dose thérapeutique efficace dans la majorité des cas.

## II PHYSIOLOGIE PLAQUETTAIRE

*In vivo*, la durée de vie des plaquettes humaines est de 10 jours. Elles circulent en effet jusqu'à ce qu'elles soient reconnues comme sénescents ou consommées par un processus hémostatique. Le plus souvent, elles sont détruites au niveau de la rate par les macrophages spléniques mais aussi au niveau du foie et de la moelle osseuse. Cette durée de vie semble précisément contrôlée mais les mécanismes sont encore inconnus (5). La numération plaquettaire normale est de  $150 \text{ à } 400.10^9/l$ .

### II-1 Structure

#### II-1-1 Structure générale

Les plaquettes circulantes sont des éléments discoïdes sans noyau ayant pour origine le mégacaryocyte de la moelle osseuse. Chaque mégacaryocyte donne naissance à environ 1000 à 8000 plaquettes. Ce sont les plus petits éléments figurés sanguins :  $3 \mu\text{m}$  de diamètre et  $1 \mu\text{m}$  d'épaisseur (7). Mais la population plaquettaire est une population hétérogène par la taille, la forme, la densité. Aucun argument n'est actuellement déterminant pour affirmer une corrélation entre ces variations et l'âge des plaquettes (4).

Le système canaliculaire ouvert à la surface est typique de la plaquette. Constitué de nombreuses invaginations de la membrane, il est important dans les échanges de substances (endocytose et sécrétion) et comme réservoir membranaire pour l'extension des pseudopodes (42).

Remarque : les plaquettes ne contiennent pas d'ADN, sauf dans les mitochondries (38).

#### II-1-2 Antigènes membranaires

La membrane joue un rôle essentiel dans les fonctions des plaquettes induites par de nombreuses substances physiologiques et non physiologiques.

Il existe deux types de membranes à considérer : la membrane externe et les membranes des différentes granules. L'expression des antigènes membranaires est fonction du statut d'activation plaquettaire.

##### II-1-2-1 Les glycoprotéines plaquettaires

Les plaquettes possèdent ancrées dans leur membrane une série de récepteurs, des glycoprotéines (GP), qui appartiennent aux grandes familles de GP membranaires qui sont des médiateurs presque universels d'interaction cellule/cellule ou cellule/matrice extracellulaire (68). Elles constituent la surface la plus externe de la membrane ou glycocalyx (74). Certaines sont exprimées sur la membrane native, d'autres après activation (60). Ancrées dans la bicouche phospholipidique, leur partie intracellulaire est en contact avec les éléments du système contractile et la partie extracellulaire sert de récepteur (7).

Seules seront envisagées les principales glycoprotéines impliquées dans la fonction hémostatique ou témoins de l'état d'activation plaquettaire et leur rôle sera précisé ultérieurement.

TABLEAU I  
GLYCOPROTEINES PRINCIPALES DE LA PLAQUETTE

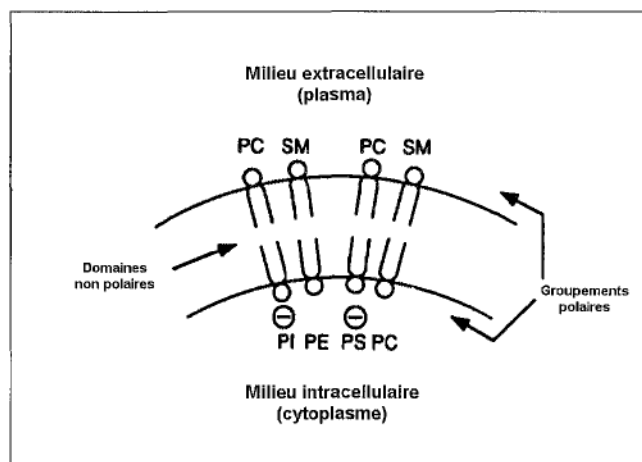
Famille	Numéro du CD	Molécule	Ligand principal
<i>Intégrines</i>	CD41/61	GPIIb/IIIa ( $\alpha_2\beta_3$ )	fibrinogène
	CD49b/29	GPIa/IIa ( $\alpha_2\beta_1$ )	collagène
	CD49e/29	GPIc/IIa ( $\alpha_5\beta_1$ )	fibronectine
	CD49f/29	GPIc'/IIa ( $\alpha_6\beta_1$ )	laminine
<i>Sélectines</i>	CD62P	GMP140	CD15
<i>Super famille des Ig</i>	CD32	Fc $\gamma$ RII	Fc des IgG
<i>Tétraspan</i>	CD9		non identifié
	CD63	GP53	non identifié
<i>GP riche en leucines</i>	CD42a/42b/42c/42d	GPIb $\alpha$ /Ib $\beta$ /IX/V	vWF
<i>Autres</i>	CD36	GPIV ou GPIIIb	thrombospondine

Les plaquettes sont aussi le support de groupes antigéniques spécifiques désignés par les allo-antigènes HPA (Human Platelet Antigen). Cinq systèmes sont actuellement décrits. Elles expriment également des molécules du système HLA classe I, et des antigènes communs à différentes lignées cellulaires : ABH, Lewis, P, M et N.

#### II-1-2-2 Les phospholipides membranaires

La membrane plaquettaire est composée de 15 % de lipides dont 80 % de phospholipides (74). Les deux feuillets membranaires ne sont pas de même nature et la membrane est asymétrique.

**Figure 1**  
**Répartition des phospholipides membranaires**



PC : phosphatidylcholine  
 PE : phosphatidyléthanolamine  
 PI : phosphatidylinositol  
 PS : phosphatidylsérine  
 SM : sphingomyéline

D'après 44

La membrane interne est pauvre en sphingomyéline (7 % du contenu total en SM), riche en phosphatidyléthanolamine (80 % de la PE totale) et phosphatidylsérine (92 % de la PS totale) (105) (85). Ces dernières sont normalement restreintes au côté interne de la membrane plasmique car une aminophospholipide-translocase les prend en charge à travers la membrane et les transporte vers le feuillet interne. Bien que cette asymétrie lipidique semble stable tant que la cellule reste inactivée, de lents échanges spontanés entre les deux feuillets de la membrane se produisent, probablement sans conséquence, et corrigés immédiatement par l'aminophospholipide-translocase (85) ou grâce à l'affinité sélective de la phosphatidylsérine vis à vis des protéines du cytosquelette interne (44).

Cette membrane interne sert de réservoir pour deux substrats importants : PE et PI

- ♦ PE contient plus de la moitié du contenu total en acide arachidonique plaquettaire, substrat de la cyclooxygénase et à l'origine de la synthèse de TXA<sub>2</sub> (64).
- ♦ PI est converti en IP<sub>3</sub> et DAG par la phospholipase C (44).

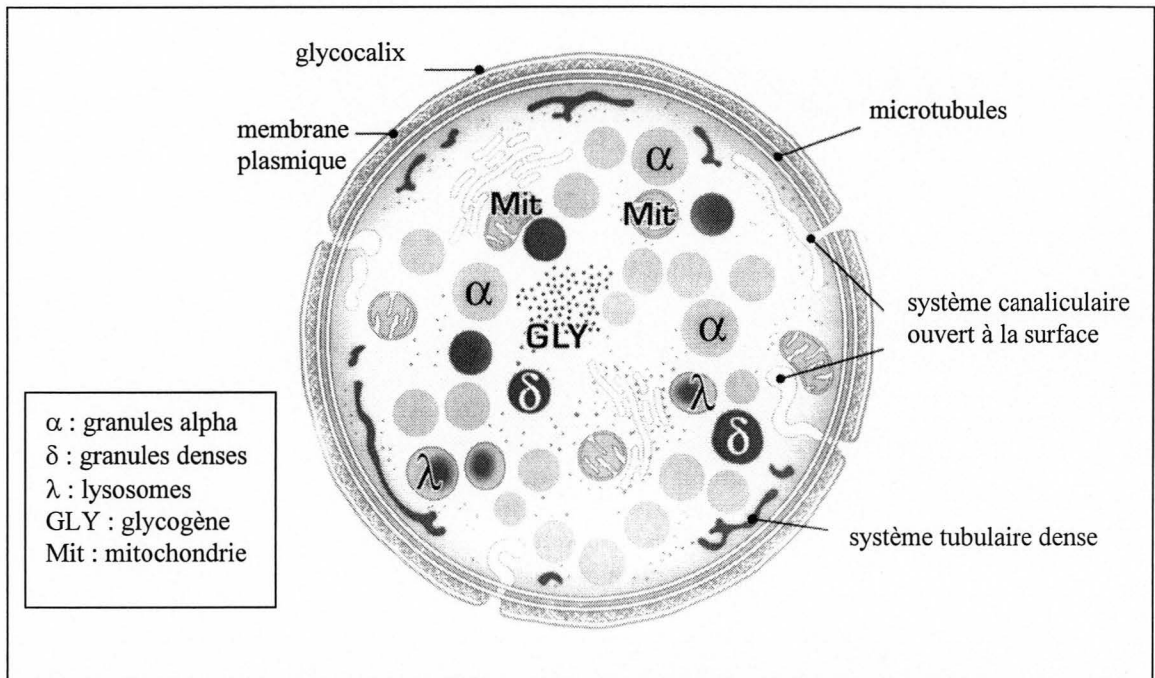
*De novo*, il existe également une synthèse intracellulaire de phospholipides. Le métabolisme des prostaglandines est très actif : l'acide arachidonique (acide gras polyinsaturé) est transformé dans les plaquettes en PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> et TXA<sub>2</sub>.

### II-1-3 Constituants intracellulaires

Le cytosquelette plaquettaire est constitué principalement de filaments d'actine dont le degré de polymérisation varie avec l'état d'activation de la plaquette et également de micro-tubules (tubuline) participant au maintien de la forme discoïde (7). Il joue un rôle majeur dans la distribution des glycoprotéines de la membrane plasmique car les filaments d'actine sont liés à la membrane des granules (42).

Figure 2

## Principales caractéristiques ultra-structurales sur une coupe équatoriale de plaquette discoïde



D'après 13

Organites dispersés dans le cytoplasme :

- ♦ des particules de glycogène
- ♦ des lysosomes et des peroxysomes (7)

Les lysosomes contiennent différentes enzymes : hydrolases acides, cathepsine, élastase, collagénase,... (103) et c'est au sein de leur membrane que se situent les molécules CD63.

Les peroxysomes sont caractérisés par leur contenu en catalase.

- ♦ en moyenne 35 à 40 granules alpha et 5 granules denses (42)

- Les granules alpha sont composées de protéines spécifiques : PF<sub>4</sub>, βTG, fibrinogène, fibronectine, vitronectine, thrombospondine, vWF, de facteurs de la coagulation (V, XI, XIII, protéine S) et facteurs de croissance (7). La membrane des granules alpha contient différentes molécules récepteurs incluant la GPIIb/IIIa, la P-sélectine (CD62P ou GMP140 ou PADGEM) et CD36, qui lors de la sécrétion des plaquettes s'expriment au niveau de la membrane plasmique, témoignant ainsi de l'activation plaquettaire (34).

- Les granules denses contiennent des métaux divalents, du pyrophosphate, de la sérotonine, de l'adénosine sous forme d'ADP et ATP.

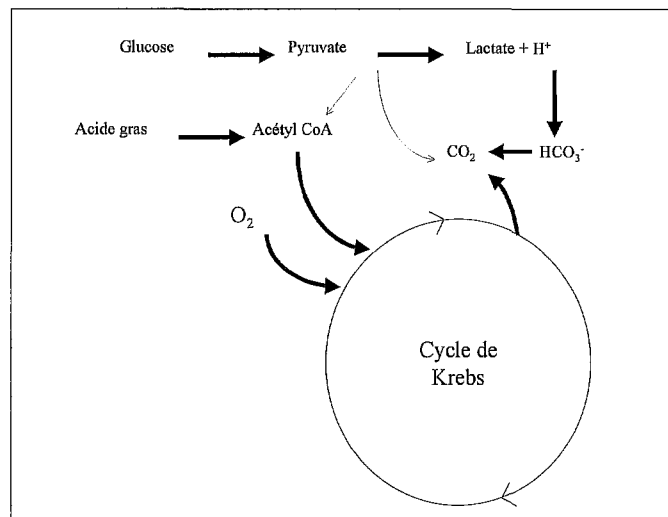
- ♦ peu de mitochondries
- ♦ le système tubulaire dense, équivalent du réticulum endoplasmique lisse des autres cellules. C'est le lieu de séquestration du calcium (7).

## II-2 Métabolisme

Les plaquettes sont caractérisées par une grande consommation d' $O_2$  (6 fois plus que la cellule musculaire au repos) (42). A la différence de la cellule musculaire, les plaquettes ne contiennent pas de créatine phosphatase ni de créatine phosphokinase mais de grandes quantités de glycogène ( $30 \mu\text{mol}/10^{11}$  cellules) dispersé de manière aléatoire dans le cytoplasme sous forme de discrètes particules (74).

Figure 3

### Voies métaboliques plaquettaires dans le plasma



D'après 64

*Par la glycolyse, une molécule de glucose est convertie en deux molécules d'acide lactique. L'intermédiaire pyruvate peut entrer dans le cycle de Krebs mais les substrats principaux pour le métabolisme oxydatif sont les acides gras libres du plasma.*

Il existe deux voies métaboliques majeures (4). La régénération de l'ATP cellulaire dérive pour 85% de la consommation d' $O_2$  par le cycle de Krebs et pour 15% de la glycolyse qui ne nécessite pas d' $O_2$  (64). Les substrats sont respectivement les acides gras et le glucose et les métabolites produits sont respectivement le  $CO_2$  et le lactate. 1 molécule de glucose consommée correspond à 2 ATP produits et 1 molécule d' $O_2$  consommée correspond à 6 ATP produits. Si la demande en  $O_2$  n'est pas satisfaite, la voie métabolique privilégiée devient la glycolyse anaérobie.

## II-3 Propriétés physiologiques : rôle dans l'hémostase

L'hémostase physiologique met en jeu quatre mécanismes principaux : contraction de la paroi vasculaire, interaction des plaquettes avec la surface lésée, activation de la coagulation et de la fibrinolyse. Les deux premières étapes sont regroupées sous le terme d'hémostase primaire et visent à l'arrêt immédiat des hémorragies dans les vaisseaux de petit calibre (clou plaquettaire). Les plaquettes ont un rôle majeur dans l'hémostase primaire et secondaire.

Elles circulent à l'état non activé (56) et leur activation en réponse à différents stimuli se déroule toujours avec la même séquence chronologique : adhérence, changement de forme (« shape change »), agrégation et sécrétion (38). Ces étapes sont des processus actifs de nature contractile, qui nécessitent une dépense énergétique fournie par l'ATP et la mobilisation d'ions  $Ca^{++}$  (38).

Les plaquettes sont activées en réponse à certaines conditions physiologiques ou pathologiques qui entraînent :

- une lésion de la paroi vasculaire (collagène présent dans le sous-endothélium)
- des modifications du débit sanguin
- l'apparition dans la circulation sanguine d'une ou plusieurs substances biologiques actives (ADP issu des cellules endothéliales vasculaires lésées ou des globules rouges, thrombine formée dès l'initiation de la coagulation plasmatique, hormones, facteurs de la coagulation et de la fibrinolyse, protéines vasculaires...). D'autres substances, au contraire, (adénosine,  $PGI_2$ ,  $PGD_2$ , monoxyde d'azote) inhibent les fonctions plaquettaires et maintiennent les plaquettes à l'état de repos.

### II-3-1 Adhérence

Il s'agit de l'interaction d'une plaquette avec une surface vasculaire ou artificielle non plaquettaire. C'est un phénomène passif.

Lorsque la force de cisaillement est faible, comme au niveau des veines et des grosses artères, le transport des plaquettes vers la paroi lésée se fait par diffusion et est augmenté par les collisions avec les globules rouges.

Lorsque les forces de cisaillement sont très élevées, comme au niveau des artérioles ou au niveau d'une sténose artérielle pathologique, le temps de contact des plaquettes avec le sous-endothélium est tellement court que pour qu'elles adhèrent, il faut que la réactivité de la paroi soit élevée. Ceci est possible grâce au facteur vWF (sécrété par les cellules endothéliales) qui se fixe au sous-endothélium (collagène de type VI) et à la GPIb des plaquettes permettant leur adhérence (13).

La fixation du vWF au niveau du sous endothélium provoque en effet un changement de conformation de la molécule qui permet son interaction avec la GPIb et active la plaquette.

Par ailleurs, il a été montré que la P-sélectine est impliquée dans l'adhérence des plaquettes activées aux polynucléaires, monocytes et macrophages, lymphocytes, dans des conditions de stase sanguine. Le ligand de la P-sélectine le plus connu est le CD15 mais d'autres molécules sont à l'étude (sulphatides, Lewis x sialylé, glycoprotéines leucocytaires). Dans des conditions de flux, des récepteurs



supplémentaires (GPIIb/IIIa) et des ligands (tels que fibrinogène, thrombospondine, et fibronectine) doivent entrer en jeu pour rendre l'adhérence irréversible entre leucocytes et plaquettes (104).

Les plaquettes semblent même jouer un rôle physiologique plus important et potentiellement plus adhésif que les cellules endothéliales pour le recrutement des leucocytes car elles possèdent une densité de surface en P-sélectine sept fois supérieure (104).

Les processus d'adhérence et d'activation, séparables *in vitro*, sont étroitement intriqués *in vivo*.

### II-3-2 Activation

L'activation plaquettaire peut être secondaire à l'adhérence ou à l'action de molécules solubles comme la thrombine. Les inducteurs d'activation ne pénètrent pas la membrane plaquettaire mais déclenchent des événements de transduction membranaire qui permettent la transmission du signal d'activation à l'intérieur de la plaquette (3). Ils agissent via des récepteurs membranaires couplés à des protéines G transductrices des signaux. Les seconds messagers produits (DAG et IP<sub>3</sub>) concourent à l'activation de la plaquette par élévation du calcium libre intra-cytoplasmique et la phosphorylation de nombreuses protéines.

L'activation plaquettaire aboutit à différents événements, en fonction du type et du niveau de stimulation.

### II-3-3 Changement de forme

L'adhérence de la plaquette à la surface vasculaire et son activation entraînent des modifications morphologiques importantes (74). Le changement de forme se définit par le passage irréversible de la forme discoïde à la forme sphérique (dépolymérisation des micro-tubules et polymérisation de l'actine), l'émission de pseudopodes et d'invaginations. Celles-ci vont au contact des granules qui sécrètent alors leur contenu (3). L'organisation des protéines du cytosquelette semble étroitement liée à l'activation (102).

### II-3-4 Agrégation

L'agrégation de plaquettes entre elles désigne un processus actif nécessitant du fibrinogène. Elle peut se décomposer en deux phases :

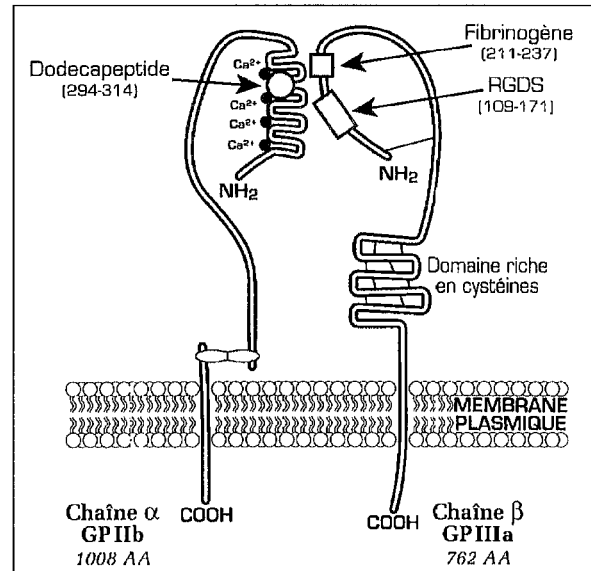
- une phase réversible au cours de laquelle le fibrinogène se détache de son récepteur et les plaquettes peuvent redevenir circulantes.
- une phase irréversible au cours de laquelle des substances libérées par les granules telles que la thrombospondine consolident les liens entre les plaquettes (49).

Des agents agrégants faibles ou de faibles concentrations d'agents forts sont responsables d'agrégation réversible tandis que des stimuli forts sont responsables d'agrégation irréversible, associée à la synthèse de prostaglandines et à la réaction de sécrétion (7).

Le complexe GPIIbIIIa (CD41/CD61) (58) est composé de deux sous-unités maintenues associées par des ions  $\text{Ca}^{++}$ .

Figure 4

## Structure schématique du complexe GPIIbIIIa



D'après 13

- La chaîne  $\beta$  comporte 4 unités riches en cystéines et le site de liaison du ligand.
- La chaîne  $\alpha$  comporte 7 domaines répétés dont 4 lient les cations  $\text{Ca}^{++}$ .

La répartition de cette glycoprotéine serait de 70 % en surface et 30 % sous forme cryptique au niveau de système canaliculaire et des membranes des granules alpha et denses (49).

Ainsi, la GPIIbIIIa est déjà présente à la surface des plaquettes non stimulées (expression basale de 50000 molécules/plaquette) et l'activation plaquettaire s'accompagne de l'apparition à la surface d'environ 45000 nouveaux sites.

Lorsque les plaquettes sont activées, l'hétérodimère subit un changement conformationnel qui concerne les parties extra-cellulaires des chaînes alpha et bêta (7) et qui permet la fixation de protéines adhésives : il y a augmentation d'affinité de la GPIIbIIIa pour ses quatre ligands (fibrinogène, facteur Willebrand, fibronectine, vitronectine) (89). Le fait qu'ils soient multivalents pour la GPIIbIIIa permet leur interaction secondaire avec les complexes GPIIbIIIa de plaquettes adjacentes et la formation de ponts entre les plaquettes (68) nécessaire pour l'agrégation (88) (82). C'est la séquence RGD commune à ces protéines d'adhérence qui permet la fixation sur les complexes GPIIbIIIa.

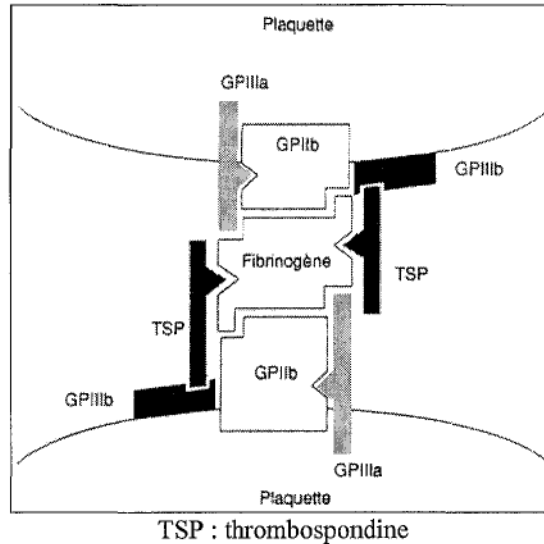
La GPIIbIIIa présenterait donc 3 conformations :

- ✓ au repos
- ✓ activée
- ✓ ayant fixé le fibrinogène (81).

La formation d'un complexe macromoléculaire entre la thrombospondine, le fibrinogène et la GPIIb/IIIa a été proposé comme une étape majeure dans le mécanisme menant à l'agrégation irréversible (72).

Figure 5

Assemblage macromoléculaire entre la thrombospondine, le fibrinogène et la GPIIb/IIIa



D'après 49

*La thrombospondine est une glycoprotéine des granules alpha. Après stimulation, la thrombospondine relarguée se lie à la surface plaquettaire (via le CD36 ou GPIIb) puis un complexe macromoléculaire se forme avec le fibrinogène.*

### II-3-5 Sécrétion

Si la concentration calcique intracellulaire atteint  $0,5 \mu\text{M}$ , il y a dégranulation, c'est à dire fusion des granules denses, alpha et lysosomes et de la membrane plasmique.

La conséquence est double :

#### II-3-5-1 Expression de nouvelles molécules à la surface plaquettaire

♦ La P-sélectine (CD62P, GMP140 ou protéine PADGEM) est un composant des membranes des granules alpha des plaquettes quiescentes, **seulement exprimé à la surface des plaquettes après la sécrétion des granules alpha** (58) (11) (96).

C'est un marqueur utile car son expression à la surface est corrélée avec le relargage du contenu de la granule alpha (26) (8). Après activation, il y aurait de 2 000 à 10 000 sites à la surface plaquettaire selon les auteurs.

♦ Le **CD63** est un composant des membranes des lysosomes plaquettaires. Il y aurait 650 molécules de CD63 sur la plaquette non stimulée et 12 600 après stimulation (60). L'intérêt de ce marqueur réside dans sa stabilité supérieure à celle de la GMP140. Il donne généralement un signal plus fort en cytométrie (18). A la différence de la sécrétion des granules denses et alpha qui est observée après stimulation avec tous les agonistes plaquettaires, la sécrétion lysosomale nécessite un stimulus puissant, seulement observé après des stimulations avec de fortes concentrations de thrombine et collagène. Aucune fonction spécifique n'a été attribuée au CD63. Mais cette molécule fortement glycosylée pourrait protéger la membrane plasmique de la dégradation due aux hydrolases lysosomiales (54).

### II-3-5-2 Libération du contenu des granules

♦ parmi les constituants des granules denses :

- l'ADP amplifie l'activation plaquettaire et provoque une agrégation faible et réversible
- la sérotonine possède un effet vasoconstricteur
- Comme la plaquette contient du calcium ionisé, celui-ci est relargué avec les autres contenus granulaires durant le processus d'activation (12).

♦ parmi les constituants des granules alpha :

- la  $\beta$ TG, qui représente 10 % du contenu des granules alpha, induit une libération de prostacycline par les cellules endothéliales vasculaires.
- le  $PF_4$  a une activité chimiotactique pour les leucocytes, il est un inhibiteur de l'angiogénèse et de la maturation des mégacaryocytes.
- le facteur V favorise la coagulation plasmatique.
- vWF et fibrinogène permettent l'adhérence et l'agrégation plaquettaires.
- la thrombospondine consolide l'agrégation plaquettaire.
- le PDGF (facteur mitogénique plaquettaire) possède un effet de rétrocontrôle négatif puisqu'il inhibe l'activation plaquettaire.

♦ parmi les constituants des lysosomes :

De grandes variétés d'hydrolases acides impliquées dans la dégradation de molécules extra et intra-cellulaires sont sécrétées. Elles pourraient être impliquées dans la dissolution du thrombus plaquettaire ou dans la dégradation de l'héparine (54).

La sécrétion des enzymes des lysosomes ne survient qu'en cas de stimulation maximale de la plaquette et le relargage doit être partiel, en opposition aux granules alpha qui relarguent la totalité de leur contenu (51).

Les protéines plaquettaires sécrétées peuvent se lier à la membrane plasmique (55).

### II-3-5-3 Cinétique

La cinétique d'apparition de ces différents marqueurs n'a pas encore été déterminée (82), mais le processus de dégranulation semble très rapide (quelques secondes) (47) et les marqueurs lysosomiaux apparaîtraient après la P-sélectine dans la cinétique de sécrétion (70). De plus, la sécrétion lysosomale est lente et incomplète (maximum 60 % des granules) tandis que 100 % des granules alpha et denses peuvent être concernées en 1 à 2 minutes (54).

D'après Pedigo, la sécrétion de deux types de granules (alpha et lysosomiales) n'est pas forcément liée aux mêmes signaux de transduction et donc l'expression de CD62 et CD63 en réponse à un agoniste donné ne semble pas équivalente. En effet, ses résultats de CMF montrent l'absence de corrélation entre l'expression de CD62 et celle de CD63 (73).

D'après Michelson, l'augmentation de l'expression de la GPIIb/IIIa à la surface plaquettaire (activation-dépendante) est réversible avec le temps (58).

De même, une étude a montré que l'expression du CD62P serait maximale 3 minutes après l'activation et qu'elle disparaîtrait après 20 minutes (72). En 1990, Fijnheer pense qu'elle n'est pas réinternalisée après sécrétion (26). A l'inverse, Home suggère en 1997 que la diminution de son expression est due à une internalisation et non à une perte de surface (37).

### II-3-6 Flip-flop membranaire

La réaction d'activation plaquettaire expose les phospholipides anioniques membranaires au niveau de la surface externe car l'augmentation du calcium intracellulaire inhibe l'aminophospholipide-translocase responsable de l'asymétrie membranaire. Elle a pour résultat une distribution plus symétrique des lipides de part et d'autre de la membrane (105).

Ceci accélère considérablement le processus de coagulation car il s'agit du développement d'une surface plaquettaire procoagulante (99) (85). Le flip-flop phospholipidique permettrait l'activation de la prothrombinase (74) (82), activité fermement corrélée avec la quantité de phosphatidylsérine exposée sur les plaquettes activées (99).

Il y a augmentation des sites de liaison pour la prothrombine (64) et la thrombine mais aussi le fibrinogène, la thrombospondine et les facteurs XIIIa (101), Va et VIIIa (60). Cette activité procoagulante était anciennement appelée facteur plaquettaire 3 (49), réaction catalysée parce que les plaquettes peuvent sécréter une forme activée du facteur V.

Ce rapide flip-flop est local et réversible car la diminution du calcium intracellulaire peut réinitialiser l'aminophospholipide-translocase. Une protéine membranaire activée par le calcium, la scramblase, permettrait aussi ce réarrangement (99). Certains auteurs pensent que ce flip-flop dépend de la disponibilité de l'ATP intracellulaire (105), d'autres pensent que la réaction ne nécessite pas d'ATP (99).

Par ailleurs, il a été observé que :

- ♦ La phosphatidylsérine exposée à la surface pourrait servir de signal de reconnaissance pour les phagocytes (85) (44).
- ♦ L'expression de phosphatidylsérine serait également associée à la sénescence et à l'apoptose (54).

#### II-3-7 Formation de micro-vésicules

Si la concentration calcique intra-cellulaire atteint la concentration de 2  $\mu\text{M}$ , en plus de l'événement sécrétoire, il y a formation de microvésicules de 100 nm de diamètre (85). Cette formation n'est pas nécessaire à l'expression de l'activité prothrombinase mais elle augmente cette activité (20).

La fonction *in vivo* de ces micro-vésicules est inconnue (28).

#### **II-4 Fonctions des plaquettes**

Les plaquettes contribuent physiologiquement à l'arrêt du saignement du fait de leurs propriétés d'adhérence (étalement de la plaquette à la surface lésée) et d'agrégation (formation du clou plaquettaire). En plus de leurs fonctions majeures dans l'hémostase primaire, les plaquettes sont impliquées dans la coagulation, la fibrinolyse, la thrombose, l'inflammation, la lutte antiparasitaire, la dissémination métastatique, les conflits immunologiques (4).

### III CONSERVATION DES PLAQUETTES DANS LES POUCHES APRES APHERESE

La conservation des plaquettes dans les poches aboutit progressivement à des lésions dites de stockage : « the storage lesion ». Cependant, en dépit de l'utilisation extensive des concentrés plaquettaires d'aphérese, les événements conduisant aux lésions biochimiques se produisant durant la préparation et la conservation sont mal connus. Les plaquettes subissent des altérations structurales, biochimiques et fonctionnelles (42) (45) qui mimeraient les modifications se produisant au cours de l'hémostase *in vivo* (15).

Le concept est le suivant : ce serait un ensemble d'effets néfastes dont le résultat commun est l'activation plaquettaire (8). *In vitro*, on peut aboutir à une perte de fonction, de viabilité ou même d'intégrité structurale (35).

Mais les conséquences *in vivo* n'ont pas été suffisamment étudiées ; une idée générale est largement retrouvée : le rendement transfusionnel plaquettaire obtenu chez le patient thrombopénique après une transfusion de plaquettes fraîches est supérieur à celui obtenu après transfusion de plaquettes conservées.

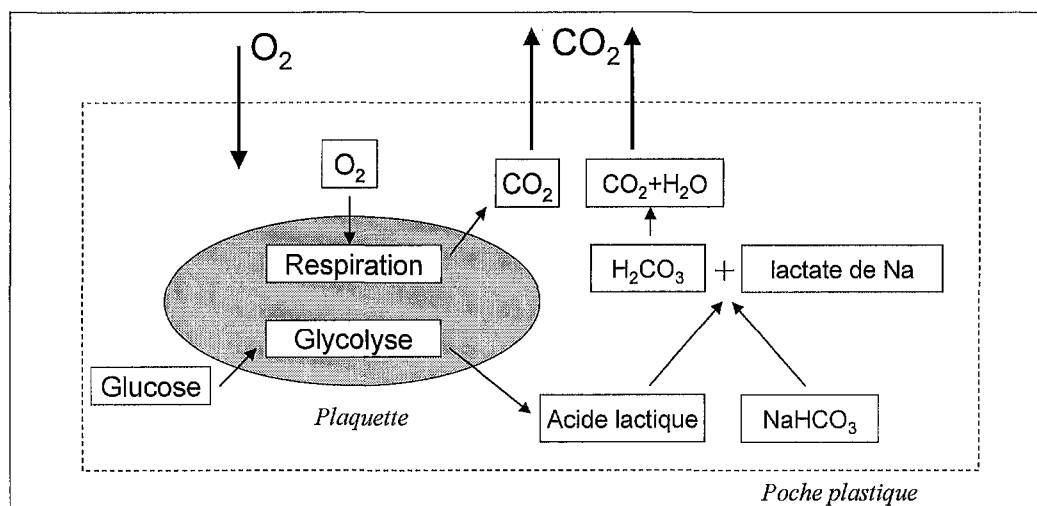
#### III-1 Modifications métaboliques du milieu

Pour leur survie, les plaquettes ont besoin d'énergie (ATP).

##### III-1-1 Métabolisme dans la poche plastique

Figure 6

Représentation simplifiée des voies métaboliques plaquettaires dans la poche



D'après 62

De l'O<sub>2</sub> est utilisé par les plaquettes et le produit final du métabolisme oxydatif est le CO<sub>2</sub>. La poche plastique doit donc avoir une perméabilité adéquate à ces deux gaz.

Le statut acido-basique des plaquettes dans la poche est caractérisé par une alcalose respiratoire initiale (faible pression partielle en CO<sub>2</sub>) compensée progressivement par une acidose métabolique (10). Le glucose est transformé en acide lactique (initialement tamponné par les bicarbonates) (63). Les bicarbonates sont à leur tour convertis en eau et CO<sub>2</sub>, ce dernier pouvant quitter la poche.

La chute de pH semble liée au fait que la demande en O<sub>2</sub> excède la capacité de la poche à le transporter (36). Cette hypoxie favoriserait la formation de lactates et il est admis que leur accumulation représente un obstacle significatif à la conservation prolongée (11). Il y a assez de bicarbonates dans le plasma pour neutraliser 20 mM de lactates. Au-delà de cette concentration, le pH chute.

Quand le pH chute de 6.8 à 6.2, il y a progressivement : gonflement des plaquettes, transformation en sphères, agglutination puis lyse (64) (78). Il a été démontré que lorsque le pH d'un concentré plaquettaire approche de 6.0, il y a également dégranulation des granules alpha et denses (78).

La recherche de milieux de conservation synthétiques (sans plasma autologue) n'a pas encore abouti. Néanmoins, l'ajout d'ions organiques dans le milieu (acétate ou pyruvate) épargne la consommation de bicarbonates (66).

La concentration plaquettaire initiale semble avoir de l'importance ; une étude a montré que des concentrations de  $1,4 \cdot 10^9$  plaquettes/ml entraînaient des altérations entre J3 et J5 tandis que des poches de concentration de  $1 \cdot 10^9$ /ml se détérioraient entre J5 et J7 (26). Mais d'autres paramètres sont à considérer comme le nombre de leucocytes résiduels ou la taille des plaquettes. Une étude suggère en effet que les plaquettes de grande taille contiennent plus d'enzymes impliquées dans la glycolyse et peuvent donc être responsables de l'acidification du milieu par génération de lactates (61).

Le maintien d'un métabolisme plaquettaire au niveau basal est préférable pour un stockage à long terme.

### III-1-2 Tests reflétant le métabolisme plaquettaire

#### III-1-2-1 pH

Le pH est apprécié comme une mesure simple *in vitro* de la qualité des concentrés plaquettaires (65) voire comme le meilleur indicateur de la survie *in vivo* (94). Mais cette affirmation est controversée (10).

Un forum international organisé en 1998 a confronté les différentes contraintes officielles pour la préparation et la conservation des concentrés plaquettaires et le pH ressort comme le principal contrôle qualité. Il doit être supérieur à 6.0 ou 6.3 ou même 6.8 à la fin de la conservation (25).

Une étude a montré qu'il reste supérieur à 6.9 jusqu'à J6 puis chute à partir de J7 : 7.3 à J1, 7.0 à J6, 6.0 à J11 (51).



### III-1-2-2 Indice de tournoiement

D'après Hägman, il peut remplacer la mesure du pH (en évitant l'échantillonnage de l'unité) (35) mais cette mesure reflète aussi un aspect morphologique plaquettaire (cf chapitre III 2-2-2).

### III-1-2-3 Glucose et lactate

Lors des protocoles d'étude de la conservation des concentrés plaquettaires, les dosages de glucose ou de lactate sont des tests préconisés pour évaluer le métabolisme des plaquettes, et plus particulièrement la deuxième voie métabolique. Ils permettent d'apprécier également les risques d'altération des plaquettes.

Concernant la formation d'acide lactique, elle pourrait être de 1,74 nmol/min/1 pour  $2 \cdot 10^9$  plaquettes. Il y a 0,52 mol de glucose consommée quand 1 mol d'acide lactique est produite (41).

### III-1-2-4 Calcium

Dans le milieu extra-cellulaire, la concentration des ions  $Ca^{2+}$  et  $K^+$  augmente progressivement au cours de la conservation (10). Une autre étude a montré que la concentration en calcium cytosolique diminue de manière significative durant les premiers jours de conservation puis augmente de manière constante ensuite (74).

Par ailleurs, des corrélations significatives ont été retrouvées entre les niveaux de calcium total et ionisé dans la poche et d'une part la concentration de lactates, d'autre part le pH (12).

### III-1-2-5 ATP

Le contenu en ATP des plaquettes semble corrélé avec leur viabilité (65). Les niveaux d'ATP et d'ADP diminuent d'environ 30 % durant une conservation de 7 jours mais on ignore si cette déplétion est la conséquence d'autres dommages cellulaires ou si elle est directement responsable d'une perte de viabilité (63).

## **III-2 Activation plaquettaire**

### III-2-1 Stimuli d'activation dans les préparations de concentrés plaquettaires

#### ❖ au niveau du donneur

- La phlébotomie amorce la réaction de coagulation et génère de petites quantités de thrombine (dépendant de la durée de la procédure) (11). Cette thrombine pourrait, en théorie, être responsable d'une partie de l'activation observée durant la préparation, mais cette thrombine reste inférieure au seuil de détection des dosages (53). Néanmoins, une activité thrombine continue est suggérée par une augmentation du fibrinopeptide A (11).

- Le stress pendant la ponction veineuse pourrait également conduire à des niveaux élevés de catécholamines circulantes pouvant influencer le statut d'activation plaquettaire (74).

Rinder souligne l'existence d'une variabilité inter-donneur concernant l'activation plaquettaire (78).

❖ au niveau de la procédure de séparation

L'aphérèse plaquettaire active les plaquettes, ce qui détermine le degré de la "storage lesion" observée ultérieurement (98).

Plusieurs éléments sont à prendre en compte :

◆ contact itératif des plaquettes avec la surface du plastique.

Durant la collecte et la centrifugation, les plaquettes sont en contact avec des surfaces synthétiques (11). Très peu d'études ont investigué la capacité des plaquettes à interagir avec ces surfaces ; les matériaux utilisés sont ceux qui activent le moins possible les plaquettes.

◆ forces de cisaillement dans les tubulures

Le sang doit en effet traverser des tubes de petits diamètres avant et après être mélangé à l'anticoagulant (74).

◆ forces de centrifugation

Il est possible que la préparation des plaquettes, impliquant centrifugation et resuspension, soit plus "stressante" pour les plaquettes que leur stockage à 22°C (79).

La question de savoir quel événement initie l'activation des plaquettes et la coagulation dans la poche n'est pas résolue : nature du plastique, charges électro-négatives à la surface de la poche ou protéines plasmatiques (plasmine) (33).

❖ amplification du processus d'activation

◆ par les plaquettes activées elles-mêmes

- exposition au TXA<sub>2</sub> qui amplifie les réactions d'activation par diffusion hors de la plaquette et fixation sur ses propres récepteurs membranaires (3),

- exposition à l'ADP issu des granules denses,

- exposition à la thrombine : une faible quantité de thrombine semble générée constamment durant le stockage. Elle serait due à la présence d'une grande activité procoagulante à la surface des plaquettes (11).

◆ par les globules rouges lysés : libération d'ADP (11) (74)

❖ autres voies possibles

Les systèmes de la coagulation, de la fibrinolyse et du complément (voie alterne via le C3a) ne semblent pas complètement bloqués par le citrate (11).

Il est difficile de comparer les études concernant l'activation des plaquettes d'aphérèse. La variabilité observée pourrait être due au séparateur utilisé, au protocole d'anticoagulation et aux caractéristiques du donneur (101). Il a été proposé que la « storage lesion » soit le résultat de l'activation se produisant durant la préparation uniquement. Ainsi, il semble que le niveau d'activation à J1 prédise le devenir de la plaquette : plus grande est la modification de chaque marqueur immédiatement après la préparation, plus grand est le niveau d'activation à la fin de la conservation (53). Ces résultats sont retrouvés dans une autre étude mais la mesure de l'activation à J1, si elle prédit les valeurs d'activation à J5, ne prédit pas le degré de lyse plaquettaire à J5 (79). George pense que même durant une conservation optimale des plaquettes, il y a activation plaquettaire (28).

### III-2-2 Détection des modifications morphologiques reflétant l'activation plaquettaire

Si une étude de microscopie électronique montre qu'il n'y a pas de modification morphologique importante durant les 5 premiers jours (48), une autre trouve au contraire que 60 % des plaquettes sont sous forme discoïde dans un concentré plaquettaire frais et que cette proportion est de 30 à 50 % après 5 jours de conservation (6). Il a même été montré qu'après 8 jours de conservation, la majorité des plaquettes sont rondes avec des pseudopodes (43).

Les controverses viennent peut-être du fait que les modifications morphologiques semblent réversibles jusqu'à J8 (48).

#### III-2-2-1 Microscopie

Le test du score morphologique a été décrit en 1973. Il se réalise au microscope à contraste de phase, en observant 200 plaquettes. Il faut établir le pourcentage de formes discoïdes, sphériques, dendritiques et ballonnées. Un facteur arbitraire est affecté à chaque pourcentage (50) (65).

Il semble admis que la viabilité plaquettaire après transfusion est corrélée avec le pourcentage de plaquettes discoïdes dans la suspension (50). Mais ce test est rarement utilisé car la méthode est longue et fastidieuse.

#### III-2-2-2 Indice de tournoiement

Il s'agit de l'inspection visuelle du concentré plaquettaire, à travers une source lumineuse, après un bref pincement du bord inférieur de la poche.

L'indice de tournoiement s'appelle aussi « swirling » ou « shimmering » (64). Cette apparence existe si les plaquettes sont parallèles les unes aux autres comme des disques (63).

En 1998, on souligne l'informativité de ce test qui apparaît comme l'une des méthodes les plus simples et les moins coûteuses pour mesurer la qualité du concentré plaquettaire, bien que subjective (30). De plus, elle est sensible et non invasive (6). Il s'agit d'une mesure qualitative mais il est possible d'établir un score arbitraire, sur une échelle de 1 à 3, pour évaluer le phénomène.

1 : absence de tournoiement

2 : tournoiement lent et de courte durée

3 : tournoiement rapide et prolongé dans le temps.

Dans de nombreux pays (France, Pays-Bas, Grande Bretagne, Nouvelle Zélande, Finlande), l'indice de tournoiement est réalisé systématiquement avant la distribution. Aux USA, on pense que l'indice de tournoiement est trop complexe pour être une valeur de routine (25).

### III-2-2-3 Cytométrie de flux

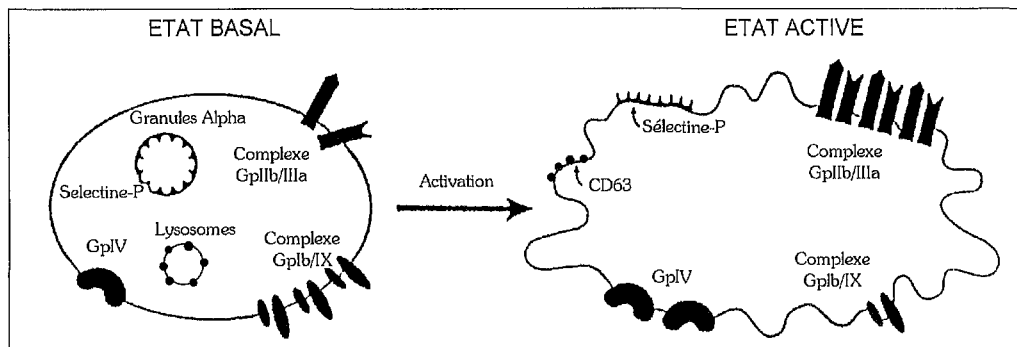
Il est possible de mettre en évidence un changement de forme en cytométrie (scattergramme) : allongement du nuage de points vers les zones de taille et granularité supérieures. En 1995, une étude a montré que ce test pourrait détecter l'activation plaquettaire *in vitro* (80). Mais il faut souligner que le « shape change » est difficile à visualiser en CMF (82) ; il s'agit d'une approche non standardisée.

### III-2-3 Marqueurs membranaires d'activation

Les marqueurs d'activation exprimés durant une conservation prolongée semblent similaires à ceux qui apparaissent après une exposition à la thrombine (51) (55).

Figure 7

#### Modifications antigéniques de surface accompagnant l'activation



D'après 40

Il est intéressant d'utiliser des anticorps activation-dépendant c'est à dire des anticorps qui se fixent seulement sur les plaquettes activées et non sur les plaquettes non activées. La cytométrie en flux a contribué à la compréhension et à la détection des plaquettes activées (55).

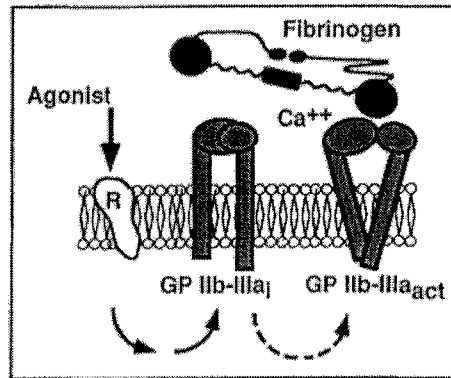
#### III-2-3-1 Le complexe GPIIbIIIa (CD41/CD61)

La conservation des plaquettes pendant 5 jours provoquerait 60 % d'augmentation d'expression de ce complexe par rapport à J0 (26). Mais ceci reste controversé puisqu'une expérience a montré une diminution significative de la GPIIbIIIa sur la membrane cellulaire quand les concentrés plaquettaires sont conservés plus de un jour (8).

Lors de l'activation plaquettaire, l'événement essentiel pour ce complexe est un changement de conformation qui "dévoile" le site de liaison du fibrinogène, comme cela a été décrit au chapitre précédent (II-3-4).

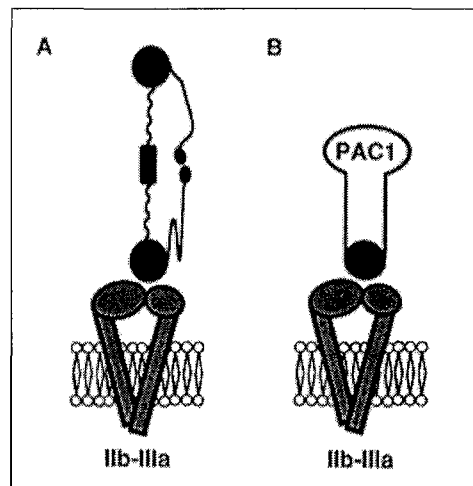
Il existe un anticorps, PAC1, qui reconnaît spécifiquement ce site et qui, de ce fait, peut être utilisé comme un marqueur du stade activé des plaquettes (58).

Figure 8  
Liaison du fibrinogène à la plaquette via la GPIIbIIIa sous sa forme activée



D'après 89

Figure 9  
Fibrinogène et PAC1 peuvent se lier à la GPIIbIIIa activée



D'après 89

PAC1 est une IgM pentamérique (88) dont la liaison à la GPIIbIIIa est inhibée de manière compétitive par le térapeptide Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) qui est présent sur la chaîne alpha du fibrinogène (87). La spécificité du PAC1 semble être due au fait qu'une de ses régions hypervariables (codée par CDR3 de la chaîne lourde) contient une séquence arginine-tyrosine-acide aspartique qui mime le RGD (1). Le Ca<sup>++</sup> semble nécessaire à l'exposition de l'épitope (plutôt que pour la réaction antigène/anticorps) (88) et l'EDTA modifie les récepteurs GPIIbIIIa (82).

Environ 50 000 molécules de fibrinogène peuvent se lier à la plaquette mais seulement 10 000 à 25 000 molécules PAC1. Ceci est dû à leur structure pentamérique multivalente (1).

PAC1 permet la détection de plaquettes activées par de faibles doses d'agonistes comme l'ADP, même quand la sécrétion ne s'est pas produite (67).

### III-2-3-2 Le complexe GPIbIX (CD42b/CD42a)

De nombreuses études (63) (58) (78) (60) (28) (55) (53) (97) montrent **une diminution du nombre de complexes GPIbIX** lors de l'activation plaquettaire par un phénomène non élucidé aujourd'hui.

Trois explications possibles concernant cette perte durant la conservation sont retrouvées dans la littérature :

- ① internalisation du complexe sur la membrane du système canaliculaire ouvert à la surface (58) (78).
- ② potentiel énergétique plus faible aboutissant à une plus faible expression de la GPIb à la surface (11).
- ③ clivage de la GPIb externe par des protéases plasmatiques (75) comme la plasmine (11) (12), la thrombine ou l'élastase des neutrophiles (74) (24) (91) présentes dans les concentrés plaquettaires.

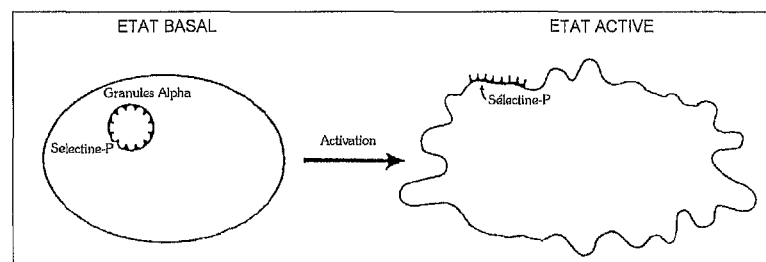
Néanmoins, cette diminution d'expression est encore controversée dans la littérature (27). Et si elle se produit, c'est seulement après 10 jours de conservation (il n'y aurait pas de modification à J5 et moins de 10 % de perte à J7, d'après une étude de 1992) (28). Mais une autre expérience contemporaine montre que la GPIb diminue de 45 % à J7 par rapport à la plaquette fraîche. Ainsi, le test d'agrégation à la ristocétine qui nécessite la GPIb est diminué après 7 jours (75).

Une étude plus récente (1997) montre que cette disparition pourrait être réversible puisque la GPIb réapparaît 30 minutes à 2 heures après l'ajout de thrombine (69). Il a d'ailleurs été montré que les plaquettes issues des CPA conservent leur capacité d'interagir avec le sous-endothélium après cinq jours de conservation (74).

### III-2-3-3 La P-sélectine

Figure 10

#### Dégranulation alpha



D'après 40

*Quand l'activation plaquettaire est accompagnée de sécrétion, la fusion des granules avec le système canaliculaire ouvert à la surface est suivie par l'apparition rapide de la P-sélectine à la surface plaquettaire.*

Au cours de la conservation des CPA, l'activation progressive peut engendrer jusqu'à 50 à 70 % de plaquettes CD62P<sup>+</sup> à J5 (76). Après J5, les résultats sont controversés : ce pourcentage pourrait continuer d'augmenter (de 10 % à J0 jusqu'à 65 % à J8) (51) ou diminuer dès J6 (21).

TABLEAU II  
PROPORTIONS DE PLAQUETTES EXPRIMANT LE CD62P  
A LA SURFACE DE LEUR MEMBRANE  
AU COURS DE LEUR CONSERVATION (DONNEES DE LA LITTERATURE)

Référence	J1	J5
36	23 %	51 %
53	16 %	28 %
21	26 %	43 %
48	< 6 %	< 6 % puis 24 % à J12

Dans les concentrés plaquettaires, le niveau d'expression de la P-sélectine est toujours modéré par rapport à une activation induite *in vitro* par la thrombine. Cela pourrait correspondre à une faible activation ou encore à une élimination de la P-sélectine de la surface plaquettaire (70).

On ne sait pas si l'expression de CD62P affecte directement la cinétique des plaquettes transfusées (101) mais Rinder affirme que cette sélectine peut être déterminante de la survie plaquettaire après transfusion (77).

Nous avons vu (II-3-1) que les plaquettes activées adhèrent aux monocytes et polynucléaires neutrophiles (52) par l'intermédiaire de ligands spécifiques :

- CD62P exprimé à la surface plaquettaire après activation
- CD15 (Lewis x) à la surface des monocytes et polynucléaires neutrophiles (39).

Il est donc possible que les plaquettes exprimant cette molécule soient préférentiellement éliminées de la circulation (77), chez des patients sains ou thrombopéniques (76). En 1991, il a été montré que les plaquettes qui ont subi un phénomène d'activation (expression de la P-sélectine) présentent une durée de vie raccourcie. Ces résultats sont très importants car ils indiquent que l'utilisation de plaquettes sans signe d'activation permettrait de garantir une meilleure efficacité transfusionnelle (77).

A l'inverse, une étude de 1998 montre que la P-sélectine, en dépit de sa liaison aux leucocytes, ne médie pas la clairance des plaquettes. Des plaquettes biotinylées et activées par la thrombine ont été infusées à des souris. Elles ont perdu leur P-sélectine de surface et cette perte était accompagnée de l'apparition simultanée d'un fragment de P-sélectine de 100 kD dans le plasma. Cette observation suggère que la P-sélectine membranaire est clivée, les plaquettes redeviennent non adhésives et ne sont donc pas préférentiellement éliminées de la circulation (5). En 1996, une autre expérience chez le babouin avait montré une perte de la P-sélectine de surface des plaquettes stimulées et réinjectées. Ces plaquettes continuent de circuler et restent fonctionnelles *in vivo* (59). Donc si la P-sélectine est clivée par des enzymes plasmatiques lorsqu'elle est à la surface plaquettaire, l'utilisation de ce marqueur

d'activation aurait un intérêt réduit (70). Sa mesure dans des échantillons de sang veineux pourrait ne pas refléter le réel niveau d'activation plaquettaire *in vivo* (98).

En 1998, la fonction *in vivo* du CD62P soluble reste à déterminer (97).

Son rôle pourrait être double :

- il pourrait inhiber le recrutement excessif des leucocytes en inhibant l'adhérence des leucocytes à l'endothélium

- il pourrait empêcher les plaquettes quiescentes de se fixer à la P-sélectine et donc éviter le recrutement excessif des plaquettes au thrombus (5).

L'expression de cette GMP140 reste toutefois préconisée comme contrôle de qualité des poches (101) (58). Certains auteurs recommandent plutôt la P-sélectine soluble (59).

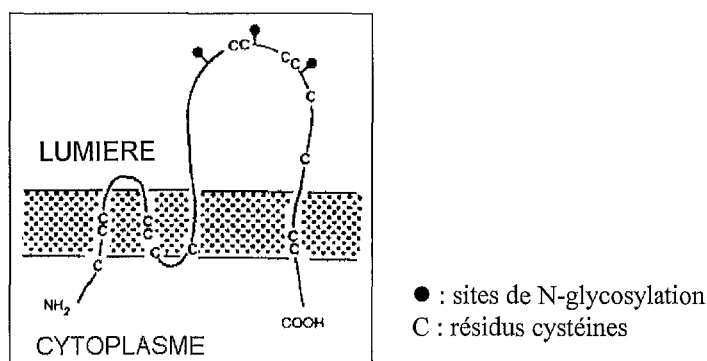
### III-2-3-4 LAMP

Une autre famille de protéines a été étudiée : les protéines de membrane associées au lysosome : LAMP, ce pourrait être de potentiels marqueurs d'activation.

LAMP1 : CD107a, LAMP2 : CD107b, LAMP3 : CD63 (21)

Figure 11

#### Représentation schématique du CD63



D'après 54

Très peu d'études sont consacrées au suivi du CD63 à la surface plaquettaire lors de la conservation des concentrés plaquettaires. La proportion de plaquettes exprimant le CD63 pourrait atteindre 35 % à J3 et rester constante ensuite (51).

### III-2-3-5 GPV

Cette glycoprotéine membranaire est clivée par la thrombine. La mesure de cette perte membranaire par cytométrie pourrait représenter un nouveau marqueur très sensible de l'activation plaquettaire, bien que spécifique de l'action de la thrombine (18).

Des marqueurs spécifiques des membranes des granules denses n'ont pas été trouvés (82).



### III-2-4 Facteurs solubles, marqueurs d'activation plaquettaire

Des études ultrastructurales ont montré que la fraction volumique des granules diminue de 43 % en 8 jours de conservation (43).

#### III-2-4-1 $\beta$ TG et $PF_4$

Les mesures de  $\beta$ TG et  $PF_4$  sécrétés sont très sensibles et spécifiques de l'activation des plaquettes. Néanmoins, la littérature ne préconise pas l'utilisation de tels dosages dans les poches (78) (94) (63), à l'exception d'une étude de Murphy soulignant qu'ils ont un degré de sensibilité approprié aux modifications ayant lieu durant la préparation et la conservation (65).

Les résultats des études de la dégranulation plaquettaire sont le plus souvent exprimés en pourcentages de relargage total. Il a été montré que le relargage de la  $\beta$ TG (contenue dans les granules alpha) augmente après 3 jours de conservation mais il existe une grande variabilité inter patient (78). De plus, les facteurs responsables du relargage continu de  $\beta$ TG au cours du temps et des larges variations entre concentrés plaquettaires du même âge ne sont pas identifiés (92).

#### III-2-4-2 P-sélectine soluble

De même, après dégranulation alpha, la P-sélectine soluble est relarguée. Ce serait la P-sélectine sans son domaine transmembranaire (5) (23). La préparation des CPA ne semble pas induire une grande sécrétion de CD62P soluble mais son augmentation dans les poches a été observée à J3 et J5 au cours de la conservation (21). Une étude de 1996 a même estimé que le dosage de la P-sélectine soluble était plus sensible que l'évaluation des plaquettes CD62P<sup>+</sup> en CMF et pourrait permettre la détection plus précoce de l'activation plaquettaire (45).

#### III-2-4-3 GPV

Une nouvelle approche est celle du dosage de la GPV, clivée par la thrombine à la surface plaquettaire. Elle est détectable dans les concentrés plaquettaires après deux jours de conservation (2).

### III-2-5 Tests fonctionnels

Il est difficile de lister les paramètres à tester pour mesurer la fonctionnalité et la viabilité plaquettaire (84).

#### III-2-5-1 Etat réfractaire des plaquettes durant la conservation

Il semble que durant la conservation, les plaquettes deviennent réfractaires aux agents activateurs comme l'ADP ou le collagène (35).

On constate en effet *in vitro* :

- une diminution de l'agrégation

L'agrégation induite par l'ADP est un test fonctionnel *in vitro* qui peut être utilisé lors de la préparation et du stockage des concentrés plaquettaires (63).

Immédiatement après la séparation cellulaire, l'agrégation induite par l'ADP atteint 78 % de la valeur obtenue sur sang total, mais seulement 29 % après 5 jours de conservation (42).

- une diminution de la sécrétion

Plusieurs études ont montré la diminution progressive au cours de la conservation du relargage de TXB<sub>2</sub>, sérotonine (10) et GMP140 soluble (8) (9) en présence d'ADP.

Il a été démontré que les plaquettes des concentrés ne répondent pas aux agonistes faibles quand ils sont testés isolément mais seulement quand ils sont couplés (74). Par ailleurs, aucune étude n'a évalué les capacités de transduction du signal durant la conservation des plaquettes.

Cependant, ces altérations semblent disparaître *in vivo* (71).

### III-2-5-2 Réponse au choc osmotique

L'étude du gonflement osmotique des plaquettes a été proposé comme test global d'approche de la viabilité. Ce test de réponse au choc osmotique mesure au cours du temps la lumière transmise à travers un plasma riche en plaquettes, après dilution dans de l'eau distillée (variation lente de pression osmotique). Le "fragilimètre" a été utilisé pour l'étude de la conservation de différents concentrés plaquettaires : il a mis en évidence une diminution de la résistance osmotique en fonction du temps de conservation (29).

*Remarque :*

La réaction osmotique réversible (ou réponse au choc hypotonique) est un test plus ancien. Il montre que la transmission de la lumière à travers un plasma contenant des plaquettes diminue brutalement après l'addition de solutions hypotoniques (65).

### III-3 Sénescence des plaquettes

Pendant plusieurs jours de conservation, une fraction de plaquettes atteint la fin de leur durée de vie normale ou meurt prématurément en raison des conditions de conservation.

#### III-3-1 Mortalité plaquettaire dans la poche

- ♦ La lyse plaquettaire provoque le relargage du contenu des granules (indépendamment de la sécrétion induite par l'activation). Quelques substances relarguées, par exemple l'ADP, activent les autres plaquettes. De plus, plusieurs cytokines et chemokines s'accumulent (celles ci provenant des leucocytes résiduels et des plaquettes lysées et activées) (42).
- ♦ L'oxygène atmosphérique serait responsable d'une peroxydation lipidique (44). Les plaquettes ont des réserves importantes de glutathion, acide ascorbique et taurine pour les protéger du stress oxydatif. Les dérivés oxygénés et les peroxydes lipidiques formés peuvent considérablement dépléter ce stock. Ainsi, durant la conservation, les plaquettes perdent des quantités significatives de glutathion dans les premières 48 heures (74).
- ♦ Les leucocytes résiduels (en quantité supérieure à 1/ $\mu$ l) pourraient contribuer à cet effet en augmentant la consommation de glucose, la production d'acide lactique et la peroxydation lipidique plaquettaire (24). Mais ceci reste controversé et il n'est pas sûr que le retrait des leucocytes améliore la viabilité plaquettaire *in vitro* et *in vivo*.

#### III-3-2 Evaluation *in vitro* de la mortalité plaquettaire

##### III-3-2-1 Mesure de la fixation de l'Annexine V

La grande affinité de l'Annexine-V pour la phosphatidylsérine, phospholipide chargé négativement (53), fait d'elle une sonde très sensible pour mesurer l'exposition de cette dernière (99). Sa spécificité est stricte (19). D'après Stuart, l'Annexine-V se lie aux bicouches lipidiques contenant plus de 5 moles % de phosphatidylsérine (99).

Il y aurait environ 5000 sites de liaison par plaquette et l'Annexine-V pourrait se lier au site de liaison des protéines vitamine K dépendantes (100).

Dans une étude concernant les concentrés plaquettaires, la proportion de plaquettes liant l'Annexine-V reste faible (10 % à J1 et 18 % à J5) (53) et reste inférieure à 20 % jusqu'à J6 (51). Mais une autre observation rapporte une augmentation de l'exposition de la PS de 2 à 12 fois entre J1 et J5 (44). Si l'on prolonge la conservation, il a été montré que 90 % des plaquettes sont Annexine-V<sup>+</sup> à J11 (51).

Dans les poches, l'augmentation de plaquettes Annexine-V<sup>+</sup> pourrait refléter les modifications structurelles dues à la baisse du pH dont le résultat est une perte de la fonction amino-translocase (51).

### III-3-2-2 Détection des micro-particules

La détection de micro-particules dont le diamètre moyen est de 0,2 µm présente des difficultés car on atteint la limite de sensibilité des techniques habituelles (microscopie optique et cytométrie) (18). Néanmoins, la quantification de ces micro-particules semble possible par cytométrie en flux (21).

### III-3-2-3 Mesure de substances relarguées après lyse des plaquettes

La LDH est une enzyme cytosolique. Sa présence dans le milieu est un marqueur de lyse plaquettaire (78). L'adénylate kinase a également été étudiée mais sa présence dans le milieu extra-cellulaire nécessite une destruction cellulaire plus sévère ; cette enzyme est probablement liée aux structures internes plaquettaires (31).

Ces tests décrits au chapitre III et permettant l'évaluation de la qualité des concentrés plaquettaires n'ont pas la même signification dans le cadre de la transfusion. En effet, deux situations cliniques très différentes se présentent : ou l'on recherche une fonction hémostatique immédiate ou bien le cadre est celui de l'action préventive impliquant la survie des plaquettes *in vivo*.

D'après S. Murphy, 5 tests sont corrélés avec la survie des plaquettes *in vivo* :

- la réaction osmotique réversible (ou réponse au choc hypotonique)
- la morphologie en microscope de phase
- l'indice de tournoiement (64)
- le niveau d'ATP,
- la quantité de GPIb à la surface plaquettaire

Mais d'autres auteurs soulignent qu'on ignore encore si cette « storage lesion » *in vitro* est critique pour les fonctions hémostatiques des plaquettes *in vivo* (74) (48), si elle donne des plaquettes circulantes inefficaces après transfusion ou si les plaquettes sont restaurées par les conditions physiologiques (8) (77).

Paradoxalement, une étude de la survie plaquettaire post-transfusionnelle chez des volontaires sains (86) a montré des résultats identiques entre des plaquettes conservées depuis 24 heures et celles conservées pendant 5 jours. En considérant le fait que la durée de vie normale des plaquettes doit être de 8 à 10 jours, ces résultats sont surprenants.

Il a été suggéré que la sénescence plaquettaire n'est pas fonction du temps mais plus dépendante d'événements *in vivo* qui limitent la viabilité.

## IV REGLES DE CONSERVATION DES PLAQUETTES

Malgré l'utilisation large des concentrés plaquettaires en clinique, on connaît peu les événements conduisant au développement des lésions biochimiques durant la préparation et la conservation de ces cellules (74) (15).

Le but est de maintenir la fonctionnalité plaquettaire dans les poches, c'est à dire la capacité des plaquettes à assurer leurs fonctions dans l'hémostase et à circuler après transfusion sans être phagocytées à cause de dommages cellulaires (64). Il convient de connaître et de contrôler les paramètres qui ont une influence directe ou indirecte sur les plaquettes et leur environnement (50).

### IV-1 Règles liées au prélèvement

Les donneurs sont soumis à des contrôles biologiques pré-dons destinés à assurer leur protection et la qualité des produits sanguins préparés à partir de leur prélèvement ; ils comprennent un hémogramme et un bilan d'hémostase au moins une fois par an. Une attention particulière est portée à la numération plaquettaire avant le don. Chaque prélèvement doit être précédé d'un examen médical comportant un interrogatoire et un examen clinique.

La circulation extra-corporelle est programmée en tenant compte du débit disponible et du recueil que l'on veut obtenir. Un logiciel intègre les paramètres du donneur pour calculer sa masse sanguine et ensuite propose une procédure en respectant la sécurité du donneur en ce qui concerne le post-compte plaquettaire et la quantité d'anticoagulant réinfusé (83).

Il est essentiel de réaliser une asepsie rigoureuse du site cutané avant la ponction veineuse.

Les bonnes pratiques de prélèvement précisent que la quantité totale de plaquettes collectées ne doit pas excéder  $8.10^{11}$  et que la durée totale de prélèvement doit être inférieure à 2h30.

Quoi qu'il en soit, les plaquettes du donneur subiront un traitement dépendant de la machine d'aphérèse choisie. Les systèmes tubulaires diffèrent dans la composition des polymères, la longueur, les connections les filtres. Les pompes et les chambres de centrifugation peuvent induire différentes forces physiques comme la turbulence, l'impact cellulaire, les fluctuations de pression, les forces de cisaillement (71).

### IV-2 Règles liées à la conservation

Cinq aspects fondamentaux :

#### ❖ poche plastique permettant l'entrée d'oxygène

Il est essentiel de maintenir le métabolisme énergétique oxydatif pour éviter la formation excessive d'acide lactique et l'acidification du milieu (35).

L'adéquation de l'apport en  $O_2$  à la bonne conservation des plaquettes a été liée à trois facteurs : le nombre de plaquettes dans la poche (de  $2.10^{11}$  à  $8.10^{11}$  ou

davantage), la perméabilité intrinsèque du plastique et la surface de la poche (64). Un auteur souligne que l'échange gazeux sera favorisé par un ratio volume contenu sur volume contenant inférieur à 1/16 (50). Les plaquettes sont souvent réparties en deux poches pour permettre des échanges gazeux suffisants. Le plastique utilisé semble le principal facteur responsable du maintien du pH aux environs de 7 (62).

❖ agitation constante

La poche doit être agitée pour permettre les échanges gazeux (63) et les concentrés plaquettaires doivent être disposés de manière à favoriser ces échanges à travers le plastique.

Une étude de la survie plaquettaire après transfusion autologue chez l'homme (plaquettes conservées 5 jours à 22°C) a montré que plusieurs agitateurs de type circulaire (2 ou 6 rpm) ou elliptique (1 rpm) donnaient des résultats similaires (94). Certaines formes d'agitation pourraient être responsables de dommages cellulaires comme l'agitation elliptique à 6 rpm (62). Ces études ont été réalisées sur des concentrés plaquettaires standards mais il n'y a pas de raison d'obtenir des résultats différents avec des CPA.

Il a été suggéré que l'agitation pourrait être bénéfique car elle maintiendrait les plaquettes en suspension pendant une période prolongée et égaliserait la production de métabolites au sein de la suspension mais ce concept n'a jamais été validé (62).

❖ milieu nutritif et anticoagulant

En 1984, on pensait que la durée de conservation d'un concentré plaquettaire était déterminé par les capacités tampon du plasma et la concentration de glucose (41). On sait aujourd'hui que, en plus du glucose, acides gras et acides aminés sont des ingrédients clé pour maintenir le métabolisme plaquettaire. Quand le plasma est utilisé comme milieu, thrombine et complément ont un effet néfaste sur la conservation (15). Mais une quantité minimale de plasma (15 %) semble essentielle pour la conservation de l'intégrité plaquettaire (42).

Le citrate composant le milieu anticoagulant chélate les ions  $Ca^{++}$  et bloque la réaction de coagulation. L'EDTA ne peut pas être utilisé car il provoque le changement de forme des plaquettes, modification associée à la diminution de la viabilité. Quant à l'héparine, elle peut provoquer l'agrégation plaquettaire (62).

Dans l'avenir, de nombreuses recherches peuvent aboutir, tant au niveau des nouveaux milieux de conservation des plaquettes qu'au niveau du revêtement plastique par des molécules diminuant l'activation de l'hémostase (83).

❖ maintenance de la température appropriée

Entre 1960 et 1970, il a été montré que les plaquettes conservées à 22°C sont hémostatiquement plus efficaces que celles conservées à 4°C (65) (90).

Une étude de la viabilité *in vivo* a montré que la température minimale était 20°C mais il n'y a pas de données concernant les propriétés plaquettaires à une température supérieure à 24°C. En 1985, la FDA préconise une température comprise entre 20 et 24°C (62). Actuellement, les poches sont placées dans une enceinte à une température régulée entre 20 et 24°C.

Si une phase de transport intervient au cours de la conservation, les concentrés plaquettaires doivent être maintenus à une température aussi proche que possible de la température de conservation. A l'arrivée, il est recommandé de les remettre sous agitation lente et continue pendant au moins 30 minutes avant la distribution.

❖ durée de conservation de 5 jours

La viabilité des plaquettes après 5 ou 7 jours de conservation est identique mais la durée est limitée à 5 jours à cause du problème de la contamination bactérienne (64). Des études ont montré que des bactéries, apparemment d'origine cutanée, sont détectables dans certains concentrés plaquettaires après 5 jours (62).

Une vigilance accrue est toutefois recommandée lors de la distribution d'une poche conservée plus de trois jours. Au Japon, les concentrés plaquettaires ne sont conservés que 72 heures (25).

Le délai entre la distribution par l'ETS et la transfusion doit être le plus court possible et inférieur à 6 heures.

#### IV-3 Règles du contrôle qualité

L'inspection visuelle de chaque connexion est essentielle car l'intégrité du système de la poche est de la plus haute importance pour éviter la contamination bactérienne. (35) Si l'indice de tournoiement est négatif, le concentré plaquettaire est écarté (25).

Deux paramètres sont contrôlés de manière régulière par échantillonnage : le nombre de leucocytes résiduels et le pH.

Les leucocytes sont connus comme médiateurs de fonctions physiologiques et pathologiques et sont responsables de différents effets secondaires *in vivo* (allo-immunisation anti-HLA, infection CMV, HTLV et prions, réactions fébriles) (95). Mais ils sont également à l'origine d'effets biologiques délétères : compétition dans la consommation d'oxygène, relargage d'enzymes, formation d'agrégats fibrinoleucoplaquettaires, génération de cytokines (50) (91). Des contenus élevés en globules blancs sont également associés à une plus grande proportion de plaquettes CD62P<sup>+</sup> dans la poche (48).

La norme maximale pour les leucocytes résiduels dans la poche est de  $1.10^6$  GB/unité, la mesure devant être effectuée dans un délai maximal de 24 heures après la déleucocytation. La fréquence cumulée des concentrés déleucocytés respectant cette limite ne peut être inférieure à 97 % avec un degré de confiance de 95 %.

TABLEAU III

CARACTERISTIQUES DU CPA (CONCENTRE PLAQUETTAIRE D'APHERESE) DELEUCOCYTE

volume	contenu minimal en plaquettes	pH	contenu en leucocytes
200 à 650 ml	$2.10^{11}$	6,0 à 7,4	$< 1.10^6$

*Le CPA déleucocyté est inscrit sur la liste des produits sanguins labiles (arrêté du 15/11/93 complété par les arrêtés du 5/04/94 et 30/03/98).*

Parce que certaines études démontrent des altérations biochimiques et fonctionnelles et que d'autres ne les retrouvent pas, il y a un besoin de contrôle de qualité et de standardisation des méthodes employées pour la préparation, la conservation et l'analyse fonctionnelle des concentrés plaquettaires.

Aujourd'hui, la recommandation générale est une vigilance accrue lors de la transfusion de plaquettes après le troisième jour de conservation (84).

Notre revue de la littérature démontre le besoin d'une étude systématique de la biochimie et des fonctions plaquettaires conservées en concentrés plaquettaires d'aphérèse (CPA), pour mieux comprendre les effets de la préparation et de la conservation des plaquettes.



# *Matériel et méthodes*

## MATERIEL ET METHODES

### PROTOCOLE D'EVALUATION DES CPA.

#### I EXIGENCES DE L'AGENCE FRANÇAISE DU SANG DANS LE CADRE DE L'EVALUATION D'UN CONCENTRE PLAQUETTAIRE DELEUCOCYTE

Conformément à l'article L.668.3 du code de la Santé Publique, avant distribution d'un nouveau produit sanguin labile, l'établissement qui le prépare doit communiquer à l'AFS<sup>1</sup> des informations relatives à ce produit. Puis la commission chargée de l'évaluation et de la validation des produits sanguins labiles donne au président de l'AFS son avis sur les dossiers de demande d'autorisation.

Le texte du 30 avril 1998 précise que les résultats d'au moins 30 contrôles effectués sur des produits finis issus de la nouvelle technologie doivent être présentés.

- ♦ Contrôle de la tolérance des donneurs à la cytaphérèse :
  - pouls
  - tension artérielle
  - constantes cyto-hématologiques avant et après la cytaphérèse
  
- ♦ Respect des caractéristiques : mesures à effectuer sur le produit fini
  - volume de la poche
  - pH
  - contenu en plaquettes
  - contenu en leucocytes
  
- ♦ Tests *in vitro* devant être réalisés au cours de la conservation à J0, J3 et J5 :
  - pH
  - taux de glucose ou taux de lactate
  - taux de lactate déshydrogénase
  - signes d'activation plaquettaire : libération de la  $\beta$ TG et/ou du PF<sub>4</sub>, et/ou de sérotonine et expression à la surface de la membrane plaquettaire d'un ou plusieurs marqueurs spécifiques de l'activation plaquettaire.
  - indice de tournoiement
  - score morphologique, ou volume plaquettaire moyen, ou réponse au choc osmotique, ou amplitude du changement de forme.

Notre dossier a été soumis pour examen à la Commission d'Evaluation des Produits Sanguins Labiles du 28 juin 1999.

---

<sup>1</sup> AFS : Agence Française du Sang  
6, rue Alexandre Cabanel  
75015 PARIS

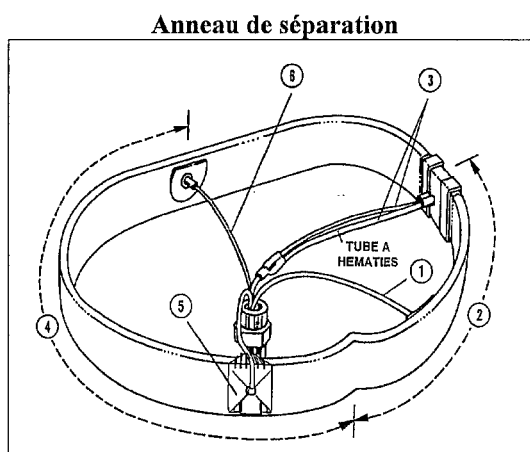
## II LE SYSTEME COBE SPECTRA LRS

Le système d'aphérèse Spectra a été conçu pour séparer et prélever les composants sanguins des donneurs.

- Le système Spectra se compose à la fois du système d'aphérèse et d'éléments jetables (anneau de séparation tournant dans la centrifugeuse et tubes assurant la circulation du sang et de l'anticoagulant).

- Le système LRS (Leukoreduction System) a été développé par COBE BCT et commercialisé en 1995. Il s'agit d'un filtre placé à proximité de l'anneau de séparation dont l'objectif est le maintien du faible taux de leucocytes résiduels dans le produit.

Figure 12



*Légende :*

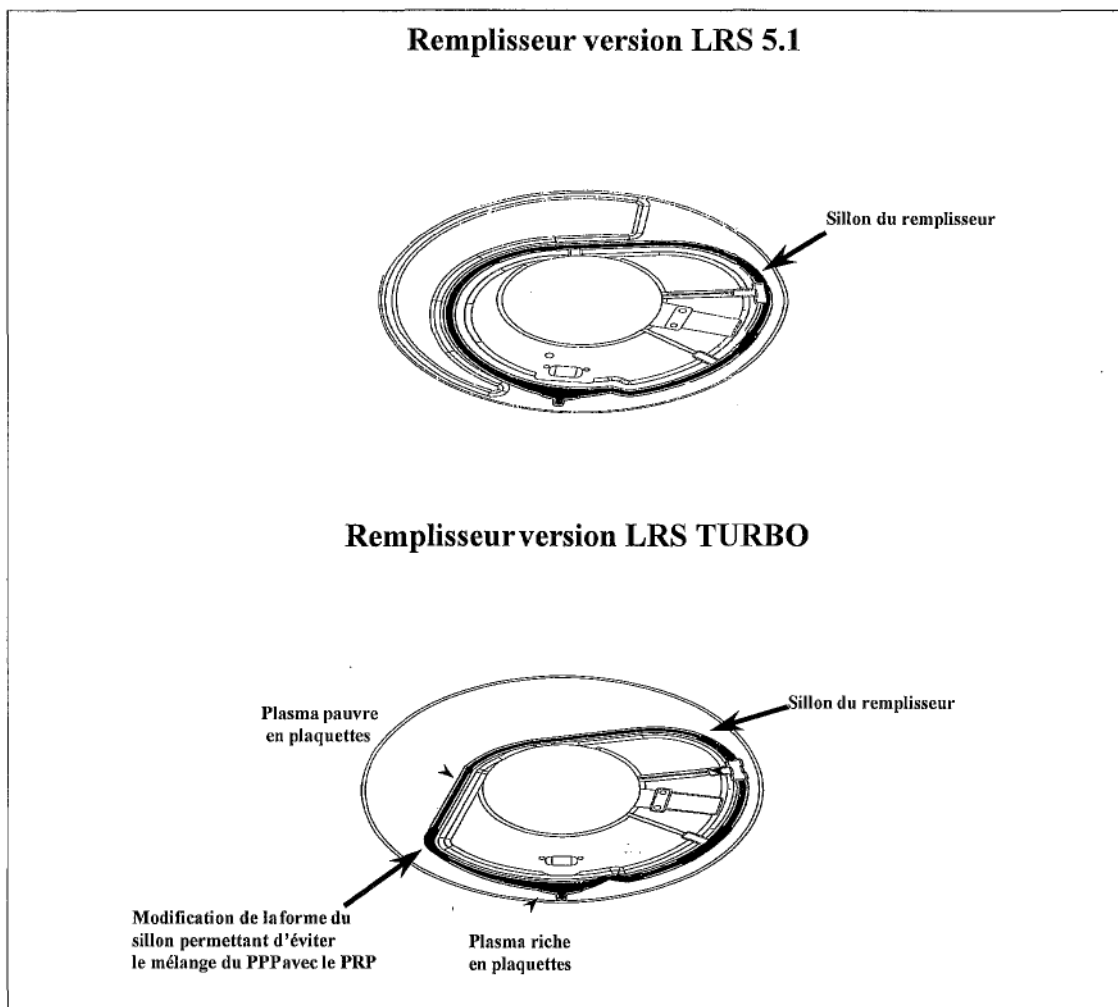
- 1 : tube par lequel le sang complet anticoagulé pénètre dans l'anneau
- 2 : les hématies et les leucocytes sont séparés du plasma riche en plaquettes (PRP)
- 3 : globules rouges sortant de l'anneau pour être renvoyés au donneur
- 4 : séparation des plaquettes et du plasma
- 5 : piège de collecte des plaquettes
- 6 : tube par lequel le plasma sort de l'anneau

La version 5.1 actuellement en cours d'utilisation en France a été modifiée afin d'augmenter le rendement de la collecte des plaquettes tout en conservant le même principe de prélèvement. La nouvelle version est appelée TURBO (ou version 7).

- Les modifications du programme concernent une élimination plus rapide du sérum physiologique au début de chaque procédure.

- La forme du remplisseur (pièce plastique contenant l'anneau dans lequel se fait la séparation des éléments figurés du sang) a été modifiée afin d'augmenter l'efficacité de la collecte des plaquettes. La nouvelle forme du sillon évite le remélange du plasma pauvre en plaquettes avec le plasma riche en plaquettes.

**Figure 13**  
**Dessins des 2 plateaux rigides dans lesquels s'insèrent les anneaux de séparation**



Le système LRS TURBO a obtenu le marquage C.E. mais une validation des produits obtenus avec ce dernier est demandée par l'A.F.S. En attendant, les produits collectés avec LRS TURBO ne peuvent pas être distribués et transfusés.

Une étude comparative a été effectuée entre les deux séparateurs de cellules Spectra équipés du système LRS : la version TURBO et la version 5.1, cette dernière constituant un système « témoin » (séparateur déjà utilisé en routine en France).

### III DONNEURS

30 donneurs volontaires en cytophérèse (13 femmes et 17 hommes) mais exclus du don car transfusés antérieurement constituent les sujets de l'étude. Les poches sont donc exclusivement consacrées à l'analyse biologique et ne sont pas transfusées. La procédure de collecte et de conservation se déroule dans les conditions habituelles. Tous les jeudis soirs, 4 donneurs sont convoqués et sont répartis aléatoirement auprès de 4 machines COBE Spectra : deux versions 5.1 et deux versions Turbo. Ils sont prélevés en mode unipuncture.

Solutés utilisés :

- Anticoagulant (Bioluflex<sup>®</sup>, laboratoire BIOLUZ) : solution d'ACD-A : citrate trisodique (22,0 g), acide citrique (8,0 g), glucose (24,5 g), eau PPI (qsp 1000 ml).
- Solution de rinçage : chlorure de sodium (poche Viaflex<sup>®</sup>, société BAXTER)
- La poche de collecte est composée majoritairement de PVC (société ELLAY), formulation confidentielle.

La cible du rendement plaquettaire a été fixée à  $3.10^{11}$  plaquettes par CPA.

Les concentrés sont conservés en agitation lente dans une enceinte thermostatée HELMER (avec disque d'enregistrement continu de la température).

Tous les donneurs ont été informés des modalités de cet essai (poches non transfusées) et ont bénéficié des examens obligatoires à la qualification biologique du don (immuno-hématologie et sérologies virales). Deux hémogrammes (en pré-don et en post-don) ont été réalisés de manière systématique chez les donneurs par le laboratoire de contrôle qualité de l'ETS. La qualification biologique du don n'a montré aucune sérologie virale positive.

#### IV OBTENTION DES PLAQUETTES EN VUE DE L'ANALYSE BIOLOGIQUE

Les différents temps de l'étude (J0, J3 et J5) englobent la durée légale de conservation de poches plaquettaires. Le même protocole est répété à J0 (vendredi matin), à partir de la première poche du kit, J3 (lundi matin), à partir d'une poche d'échantillonnage Mako Pharma (connexion stérile) et J5 (mercredi matin), à partir de la deuxième poche du kit.

Remarque : une connexion stérile utilise un dispositif permettant de connecter stérilement une tubulure à une autre.

Avant chaque échantillonnage, l'indice de tournoiement est apprécié à travers une source lumineuse, après un bref pincement du bord inférieur de la poche. Un score arbitraire est attribué à la poche :

1 : absence de tournoiement

2 : intermédiaire

3 : tournoiement rapide et prolongé dans le temps.

La présence d'agrégats plaquettaires ou de fibrine est également notée. Puis la poche contenant la suspension plaquettaire est aliquotée de la façon suivante :

❶ Remplissage d'un tube de verre siliconé de 5 ml DIATUBE H<sup>®</sup> Vacutainer commercialisé par Becton Dickinson avec additif Stago :

- solution de citrate de sodium/acide citrique (0,109 M), pH = 5,4

- inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire :

♦ théophylline

♦ adénosine (3,7 mMol)

♦ dipyridamole (0,198 mMol) Le choix de ce tube est justifié par (46)

Ce tube est refroidi à + 4°C pendant 12 heures avant son utilisation. Il est positionné dans la glace pilée avant son remplissage (le vide est cassé par l'ouverture du tube). Il est ensuite centrifugé à 3000 tours/minutes (1300 g) pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est aliquoté en cryotubes, congelés à - 20°C (dosages ultérieurs de la  $\beta$ TG et du CD62P soluble). La continuité de la chaîne de froid est impérative. Remarque : la durée maximale de conservation n'excède jamais un mois.

② Remplissage d'un tube plastique de 10 ml pour la mesure immédiate du pH à l'aide d'un pH-mètre HANNA Instruments référence HI 9025C. La gamme s'étend de 0,00 à 14,00 et la résolution est de 0,01. Le pH de 2 solutions contrôle de pH connu (7 et 4) est mesuré de manière systématique à J0, J3 et J5. Les écarts tolérés sont au maximum de 0,5 unité pH.

Le tube est rempli avec précaution pour éviter les turbulences et la mesure s'effectue immédiatement pour éviter les échanges gazeux.

Nous avons utilisé la formule :  $pH_{37} = (pH_{22} + 0,501) / 1,0975$

Plusieurs tests préliminaires ont été effectués pour valider la mesure du pH :

- mesures réalisées sur tube sec rempli par un système Vacutainer pour éviter tout échange gazeux.

- mesures réalisées en double avec un autre pH-mètre du laboratoire : HANDYLAB1.

- envoi des poches à Chambéry (contrôle qualité).

Les résultats obtenus sont comparables aux mesures effectuées au laboratoire.

③ Remplissage d'un tube FALCON de 50 ml en polypropylène.

Le contenu de ce tube est ensuite réparti à l'aide d'une pipette en polystyrène dans plusieurs tubes de verre dont un tube citraté. La surface de contact en verre (délai d'attente inférieur à une minute) n'influence pas le statut d'activation plaquettaire (résultats non présentés).

♦ Les tubes de verre sont ensuite distribués dans les différents secteurs (laboratoires de l'ETS) :

- étude de l'activation plaquettaire par cytométrie de flux (CMF)

- mesure du taux plaquettaire, volume moyen plaquettaire (VPM) et mesure des globules blancs résiduels en cellule de Nageotte à J0

- numération des globules blancs résiduels par CMF (J0)

♦ Le tube citraté est centrifugé dans les mêmes conditions que le DIATUBE H<sup>®</sup>. Le surnageant est aliquoté en 2 cryotubes :

- le premier est pris en charge immédiatement par un coursier qui l'apporte au laboratoire d'enzymologie (CHU) pour le dosage de la LDH.

- le deuxième est congelé à -20°C (dosage ultérieur de glucose au CHU).

## V ACTIVATION PLAQUETTAIRE MESUREE PAR CYTOMETRIE DE FLUX

### V-1 fixation cellulaire

- Paraformaldéhyde (PF) MERCK à 4 % : commercialisé en tablettes, il est pilé puis dissous dans du PBS à 60°C sous agitation pendant 2 heures. La solution est filtrée après refroidissement et le pH est ajusté à 7,4 avec une solution de NaOH 0,2 N. Conservation à +4°C. Utilisation de PF à 1% après dilution extemporanée dans du PBS.

- PBS : phosphate buffered saline (GIBCO) avec 150 mM de NaCl et 20 mM de  $K_2PO_4$  (sans calcium pour éviter une activation plaquettaire artéfactuelle). Cette solution est utilisée pour tous les lavages.

La suspension plaquettaire est diluée au 1/20<sup>e</sup> à l'aide d'une pointe en polyéthylène dans du PF à 1% (tubes en polystyrène). La fixation a lieu pendant 10 minutes à température ambiante puis le tube est centrifugé 10 minutes à 3000 tours/minute. Un lavage en PBS est suivi du marquage.

L'étude de plaquettes non fixées a été réalisée en diluant les plaquettes dans du PBS.

Des activations cellulaires *in vitro* ont été réalisées dans le but d'obtenir des témoins positifs d'activation.

#### ■ Solution d'ADP SIGMA

Après reconstitution, [ADP] =  $1.10^4$  mol/l. Cette solution est diluée au 1/2 avant utilisation.

Mode opératoire : 450 µl de PRP à 300 G/l + 50 µl de solution d'ADP (concentration finale en ADP = 5 µmol/l)

■ PMA : Phorbol 12-myristate 13-acétate (SIGMA) dilué à 1,25 mg/ml en DMSO. Des aliquots de 10 µl sont congelés à -80°C. On utilise 5 ng pour  $10^6$  cellules. La dilution s'effectue extemporanément dans du PBS.

■ Thrombine humaine Fibrindex (ORTHODIAGNOSTIC), utilisée à la concentration de 0,5 U/ml pour une suspension plaquettaire à 300 G/l.

### V-2 marquage membranaire

TABLEAU IV  
ANTICORPS UTILISES

anticorps	marque	clone	isotype	fluorochrome	volume ( $1.10^6$ cellules)
CD62	BD	AC1.2	IgG <sub>1</sub>	PE	20 µl
CD63	Immunotech	CLB-gran12	IgG <sub>1</sub>	FITC	20 µl
CD61	Immunotech	SZ21	IgG <sub>1</sub>	FITC	20 µl
PAC1	BD	PAC-1	IgM	FITC	20 µl

PE = phycoérythrine, FITC = fluoresceinisothiocyanate.

Les plaquettes sont numérotées à l'aide d'un compteur de cellules Coulter. Pour interpréter correctement les résultats d'immunomarquage, il est nécessaire de déterminer la proportion de fixation non spécifique à l'aide d'un anticorps ayant les mêmes caractéristiques (isotype et fluorochrome) que l'anticorps utilisé. Les cellules sont mises en contact avec l'anticorps marqué par un fluorochrome, pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité, puis lavées en PBS (10 minutes à 3000 tours/minute).  
Remarque : après chaque centrifugation, les cellules sont remises en suspension progressivement (pas de vortex à cause de la grande fragilité des plaquettes).

### Cas particulier :

◇ annexine V : IMMUNOTECH  
Solution de travail : 247,5 µl de tampon  
2,5 µl Annexine V

La suspension cellulaire (250 000 plaquettes) est mise en contact avec 250 µl de la solution de travail pendant 10 minutes, à l'obscurité avant le passage en cytométrie.

### V-3 cytométrie en flux

L'appareil utilisé est le FACScan (FACS = Fluorescent Activated Cell Sorter) associé au programme CELLQuest (BECTON DICKINSON) permettant l'acquisition et l'analyse des cellules marquées. Chaque échantillon, dilué dans du PBS, est installé au niveau de l'aiguille de prélèvement de l'appareil.

1<sup>er</sup> temps : réglage

2<sup>e</sup> temps : acquisition et stockage des événements (50000). Deux spectres d'émission sont analysables ;  
FL<sub>1</sub> : 530 +/- 30 nm pour FITC  
FL<sub>2</sub> : 585 +/- 42 nm pour PE

Chaque cellule passe une par une devant un faisceau laser. La diffraction de la lumière donne des informations :

- aux petits angles : sur la taille cellulaire (FSC)
- à angle droit : sur la granularité cellulaire (SSC)

Chaque témoin isotypique utilisé permet de définir un seuil de fluorescence au-delà duquel les cellules seront considérées comme « positives ». Pour chaque anticorps utilisé, on peut exprimer ce résultat de cellules positives en pourcentage des cellules totales sélectionnées (fenêtre concernant la population plaquettaire définie selon des critères de taille et granularité et contrôlée par un marquage initial avec un anticorps anti-CD61). Ce pourcentage représente la fraction de plaquettes exprimant l'antigène étudié à sa surface.

En parallèle, il est important de mesurer la densité des antigènes, en plus de la fréquence des cellules exprimant cet antigène. Cette densité est appréciée par la mesure de la moyenne de fluorescence. Pour standardiser cette mesure, nous avons utilisé des billes conjuguées à la phycoérythrine, standardisées et calibrées, commercialisées par Becton Dickinson : QuantiBRITE. Les tubes contiennent 4 niveaux de billes très homogènes et précalibrées : 1400, 14000, 36600, et 182000 molécules PE/bille. Ces billes sont fournies sous forme déshydratée ; la suspension



est reconstituée avec du tampon phosphate salin. Elles se conserve à 4°C pendant 48 heures.

Cette quantification nous permet de comparer les moyennes géométriques de fluorescence obtenues aux différents temps de l'étude. Nous avons utilisé un rapport de moyennes géométriques de fluorescence :

$$R = \frac{\text{moyenne géométrique de fluorescence totale}}{\text{moyenne géométrique de fluorescence des billes 1400.}}$$

## VI DETERMINATION DU NOMBRE DE LEUCOCYTES RESIDUELS

### VI-1 Cellule de Nageotte (technique de référence)

Liquide de Lazarus : solution à 5% d'acide acétique dans de l'eau distillée + 5 gouttes de bleu de méthylène pour 500 ml.

50 µl de suspension plaquettaire homogénéisée sont mélangés à 450 µl de liquide de Lazarus pendant 5 minutes. Puis la cellule de Nageotte est montée. Ses 40 bandes (volume correspondant à 50 µl) sont observées au microscope (X 25) après une attente de 20 minutes en chambre humide. La limite de détection est de 0,2 leucocyte / µl.

### VI-2 CMF

Utilisation du kit LeucoCOUNT contenant :

- le réactif de marquage (iodure de propidium, colorant de l'ADN cellulaire des leucocytes, un agent perméabilisant et une ribonucléase). Les leucocytes sont des cellules nucléées qui contiennent de l'ADN ; ils sont marquées par le colorant. Les particules non nucléées (plaquettes) ne sont pas marquées.
- les tubes TruCOUNT avec des billes servant de référence interne pour déterminer avec exactitude le compte absolu de leucocytes résiduels.

100 µl d'échantillon sont ajoutés aux billes puis marqués à l'aide de 400 µl du réactif (incubation de 5 minutes à l'obscurité et à la température du laboratoire) avant acquisition sur un cytomètre de flux : FACSCalibur

Calcul :

$$\text{leucocytes}/\mu\text{l} = \frac{\text{événements leucocytaires X nombre de billes}}{\text{événements de billes X volume de l'échantillon}}$$

Le réglage du cytomètre et l'évaluation de ses performances sont réalisés par le logiciel FACSComp. Ce logiciel de contrôle qualité s'utilise avec les billes CaliBRITE pour mesurer la séparation entre le signal positif fourni par les billes et le bruit de fond (ajustement de l'électronique de manière à placer les billes CaliBRITE à des valeurs de canaux connues). Le contrôle est hebdomadaire.

## VII VPM ET TAUX PLAQUETTAIRE

Après agitation de la suspension plaquettaire pendant 5 minutes, une dilution au 1/4 avec du plasma (tubulure conservée à +4°C) est effectuée avant le passage sur automate Coulter Conter Plus STKR de la société Coultronics.

Contrôle qualité : trois échantillons « 4C plus Coulter Cell Control » sont analysés de manière systématique :

- le contrôle normal, tous les jours
- les contrôles haut et bas, tous les deux jours.

## VIII DOSAGES ELISA

TABLEAU V  
CARACTERISTIQUES DES DOSAGES

Molécule	Laboratoire	Ac monoclonal	Substrat	Arrêt	Dynamique de mesure
GMP 140	TAKARA	De rat, conjugué à la POD	TMB	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N	10 à 640 ng/ml
βTG	STAGO	De lapin, conjugué à la POD	OPD	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6N	12,5 à 200 UI /ml

POD = peroxydase

TMB = tétraméthylbenzidine

OPD = ortho-phénylène diamine

Il s'agit de dosages immunoenzymatiques de type sandwich.

La décongélation avant dosage a lieu à température ambiante.

Dans les puits d'une plaque de microtitration recouverts du premier anticorps monoclonal, sont incubés les échantillons à doser ou les standards ainsi que le deuxième anticorps monoclonal couplé à une enzyme. Les dépôts des échantillons sont effectués en double. La courbe étalon doit être effectuée simultanément au dosage des échantillons.

L'activité enzymatique est révélée par l'addition d'un substrat chromogène.

TABLEAU VI  
CHRONOLOGIE DES DOSAGES

ETAPES	Fixation de l'antigène	Nombre de lavages	Fixation de l'immunoconjugué	Nombre de lavages	Coloration
GMP 140	2 heures	3	1 heure	4	15 minutes
βTG	1 heure	5	1 heure	5	3 minutes

L'intensité de la coloration développée est proportionnelle à la concentration de βTG ou GMP140 présente dans l'échantillon ou le standard. Si l'échantillon analysé a une concentration supérieure au standard le plus élevé de la gamme, il est dilué avec le même diluant que celui utilisé pour les standards.

La validation du dosage de  $\beta$ TG est rendue possible par la mesure du taux de  $\beta$ TG d'un réactif contrôle (contenant une quantité connue de  $\beta$ TG purifiée humaine). Il sert de contrôle qualité systématique.

## **IX GLUCOSE ET LDH**

Dosages selon les recommandations de la SFBC (Société Française de Biologie Clinique).

Méthode de dosage LDH : détermination cinétique de l'activité de la LDH : dosage spectrophotométrique réalisé avec le kit Boehringer Mannheim au laboratoire de Biochimie B du CHU.

Méthode de dosage du glucose : technique colorimétrique utilisant la glucose oxydase sur l'automate Hitachi 917 du laboratoire de Biochimie C du CHU (kit Boehringer Mannheim).

## **X ANALYSE STATISTIQUE**

Nous avons utilisé un test de Student bilatéral sur 30 échantillons pairés (variables quantitatives). La distribution de la population est supposée normale. Le coefficient de confiance est de 95 %. Les tests de corrélation sont également réalisés avec un coefficient de confiance de 95 %.

Les calculs ont été effectués sur le logiciel Excel 97 sous Windows 98.

La mise en œuvre de cette validation a été réalisée en étroite collaboration avec la société COBE (1-3 Boulevard Charles de Gaulle à Colombes 92700).

# *Résultats*

## RESULTATS

40 donneurs ont été inclus dans le protocole. 10 ont été exclus pour les raisons suivantes :

- ♦ 2 CPA ne contenaient pas suffisamment de plaquettes ( $< 2.10^{11}$ )
- ♦ 2 donneurs ont subi une opération chirurgicale après le premier don
- ♦ 1 donneur présentait un déficit en protéine C
- ♦ 1 donneur a été prélevé deux fois sur la même version, par erreur
- ♦ 1 CPA obtenu était trop lipémique pour évaluer l'indice de tournoiement, et ceci lors des deux aphérèses.
- ♦ 3 donneurs n'ont pas été convoqués pour le deuxième don (échantillon de 30 donneurs imposé par l'AFS)

Les résultats présentés concernent donc **30 donneurs**. Tableau VII.

Pouls et tension artérielle ont été contrôlés avant et après la cytophèrese. Les 60 procédures se sont déroulées sans incident.

Nous avons mesuré les paramètres hématologiques des donneurs (avant et après le don) qui sont indiqués sur le Tableau VIII.

Les hémogrammes ne montrent pas d'anomalies hématologiques. Une leucocytose (polynucléaires) modérée à 12,2 G/l et sans étiologie identifiée est retrouvée pour un donneur.

### I PERFORMANCES DU SEPARATEUR

#### I-1 Efficacité de collecte

L'efficacité de collecte est calculée d'après la formule suivante :

$$\text{efficacité de collecte} = \frac{\text{PLT extraites}}{\text{PLT ayant transité dans la machine}} = \frac{\text{nb de PLT de la poche}}{\text{précompte plaquettaire (VST-AC)}}$$

VST : volume sanguin total  
 AC : volume d'anticoagulant  
 PLT : plaquettes

Les valeurs obtenues sont précisées sur le tableau IX.

Nous n'avons pas comparé les concentrations plaquettaires obtenues dans les deux types de poches car les conditions de prélèvement étaient définies par l'obtention d'une quantité de plaquettes de  $3.10^{11}$ . Les collectes avaient une durée moyenne de 76 minutes (minimum de 54 minutes et maximum de 110 minutes).

Nous avons retenu un avantage pour la version Turbo concernant :

- le ratio nombre de plaquettes collectées/durée du prélèvement :  $3,9.10^9/\text{min}$  pour 5.1 et  $4,4.10^9/\text{min}$  pour Turbo, ( $p = 0,002$ ),
- l'efficacité de collecte : 40 % pour 5.1 et 43 % pour Turbo, ( $p = 0,003$ ).

## I-2 Conséquences sur le taux plaquettaire

Les numérations plaquettaires pré-don sont dans les valeurs normales (moyenne = 243 G/l) sauf pour un donneur dont la valeur est subnormale (141 G/l). La moyenne obtenue en post-don est de 158 G/l avec une valeur minimale à 95 G/l pour le donneur 85521327. Après la thrombaphérèse, le taux plaquettaire est abaissé en moyenne de 31 % pour la version 5.1 et de 34 % pour la version Turbo. La différence n'est pas statistiquement significative ( $p = 0,10$ ). Tableau VIII bis.

## I-3 Caractéristiques des CPA

Les 60 CPA obtenus ont un volume moyen de 260 ml (minimum 228 ml et maximum 404 ml) et contiennent au minimum  $2,1 \cdot 10^{11}$  plaquettes. Tableau X.

La présence d'agrégats visibles à l'œil a été notée pour 6 CPA issus de 5.1 et 3 CPA issus de Turbo.

Les leucocytes résiduels ont été comptés à J0, par deux techniques différentes (cellule de Nageotte et cytométrie en flux) et le maximum obtenu est  $2,4 \cdot 10^5$  leucocytes dans la poche par la technique de référence (cellule de Nageotte). Tableau XI.

A titre indicatif, le nombre de CPA dans lesquels des leucocytes ont été détectés par les deux techniques est de 4 pour la version Turbo et 1 pour la version 5.1.

Nos résultats sont donc conformes aux caractéristiques exigées pour ce type de produit sanguin labile : volume compris entre 200 et 650 ml, contenu en leucocytes  $< 1 \cdot 10^6$  et quantité de plaquettes  $> 2 \cdot 10^{11}$ .

## II ETUDE DE L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE PAR CMF

### II-1 Mise au point pour la cytométrie de flux

Plusieurs approches sont à notre disposition pour évaluer par CMF les différents modes de réponse des plaquettes à une activation :

- modification conformationnelle de la GPIIb/IIIa : mise en évidence par la réactivité avec l'anticorps PAC1
- dégranulation alpha : présence de CD62P membranaire, de CD62P soluble et de  $\beta$ TG relargués dans le milieu
- dégranulation lysosomale : expression membranaire de CD63
- exposition des PS à la surface externe de la membrane : liaison de l'AnnexineV

#### II-1-1 Fenêtrage sur la population plaquettaire

Pour chaque acquisition au cytomètre de flux, nous avons sélectionné la population plaquettaire selon des critères de taille et granularité (FSC/SSC). Les débris cellulaires, les micro-particules ou autres populations cellulaires éventuellement présentes n'étaient jamais prises en compte. Un marquage préliminaire de la GPIIIa (CD61 : antigène pan plaquettaire) nous a permis de contrôler les dimensions et le positionnement de cette fenêtre.

Le scattergramme FSC/SSC (schéma A **Figure 14**) ne sera pas représenté pour la suite des résultats mais l'acquisition a lieu systématiquement sur cette fenêtre. Pour les différents anticorps utilisés, nous avons choisi la représentation en histogramme de fluorescence : en abscisse l'intensité de fluorescence des plaquettes et en ordonnée le nombre de plaquettes. Sur chaque histogramme, nous avons positionné des barres ( $M_1$  et  $M_2$ ) pour différencier la population positive et négative (par rapport au témoin isotypique qui représente la fixation non spécifique : schéma B **Figure 14**). L'appareil calcule ensuite le nombre, la proportion d'événements dans chaque catégorie et la moyenne de fluorescence.

### II-1-2 Expression des résultats

L'analyse par CMF nous procure donc une double information :

- le pourcentage de plaquettes exprimant un antigène donné,
- Sur l'exemple de la **Figure 14**, la proportion de plaquettes fluorescentes ( $M_2$ ) de l'échantillon D (57 %) est supérieure à celle de l'échantillon C (35 %).
- la moyenne géométrique de fluorescence totale qui reflète le nombre moyen de molécules antigéniques à la surface de la plaquette.

Sur la **Figure 14**, elle est de 4,80 pour C et 8,23 pour D.

Sous certaines conditions, il est possible de quantifier précisément ce nombre moyen d'antigènes par plaquette en utilisant des billes calibrées : billes avec un nombre défini de molécules fluorescentes à leur surface. Un exemple est donné sur la **figure 15** : les 4 pics obtenus correspondent à 4 populations de billes différentes. Elles présentent 1400, 14000, 36600 ou 182000 molécules PE.

Deux pré requis sont imposés pour exploiter les résultats obtenus :

- ① l'anticorps doit être conjugué à la PE, à raison d'une molécule PE par anticorps,
- ② le nombre de sites mesurés doit être supérieur à 1400 par cellule (dans le cas de ce kit)

La moyenne de fluorescence de CD62P étant presque toujours inférieure à celle de la bille la moins fluorescente, même après activation, on se trouve en dehors de la zone de linéarité définie par ce kit ; il n'est donc pas possible de l'exploiter pour définir le nombre d'anticorps anti-CD62P liés sur les plaquettes.

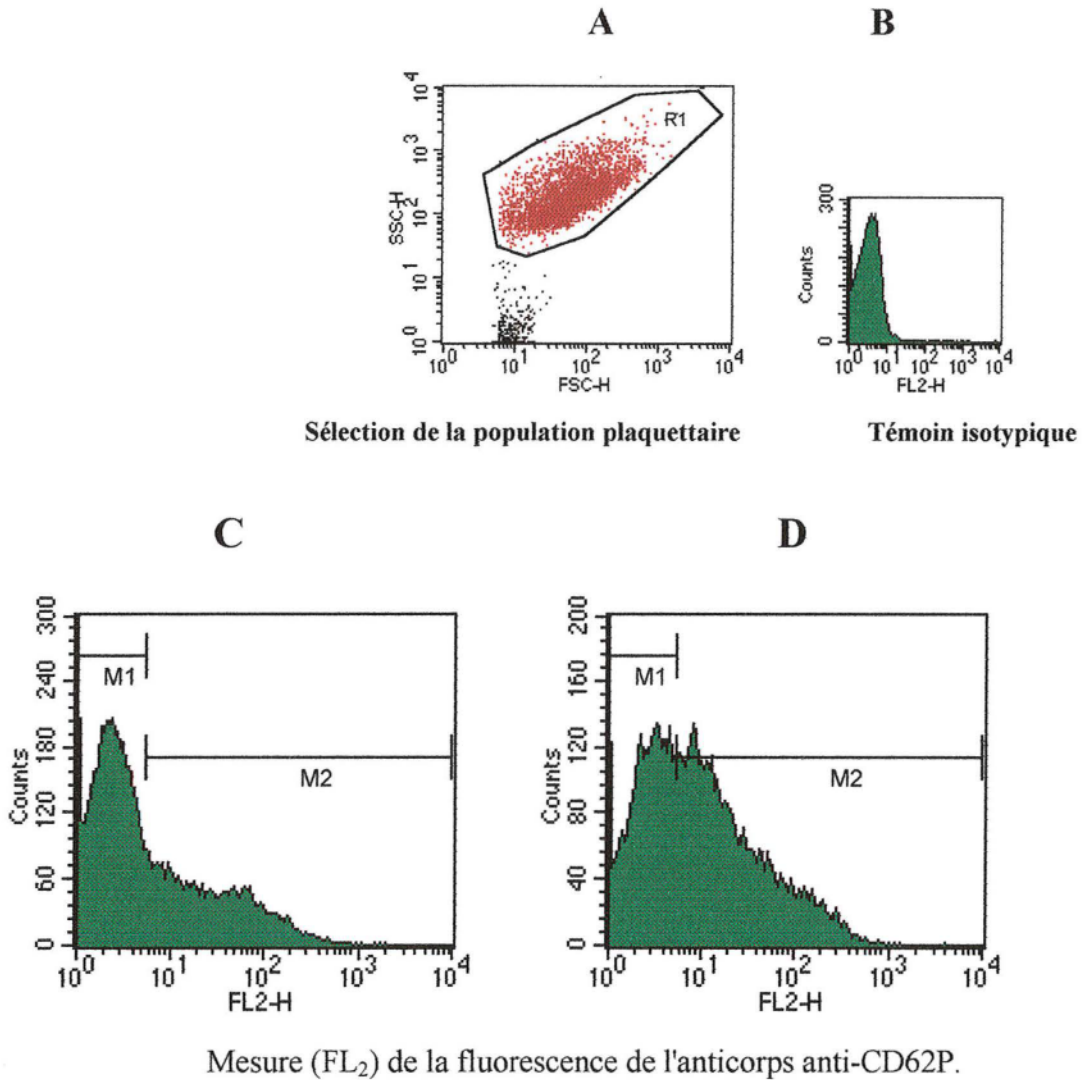
Nous l'avons donc utilisé simplement pour standardiser le test, en calculant le rapport :

$$R = \frac{\text{moyenne géométrique de fluorescence de l'échantillon}}{\text{moyenne géométrique de fluorescence des billes 1400.}}$$

Pour le numérateur, nous avons choisi la moyenne de fluorescence totale de l'échantillon plutôt que celle des plaquettes CD62P<sup>+</sup> ( $M_2$ ) car la détermination du seuil de positivité est délicate. Grâce aux billes, les résultats peuvent être comparés pendant toute la durée du protocole.

**Figure 14**

**Expression des résultats obtenus en CMF**



**C**

Gated Events: 45752      Total Events: 50000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 991	45752	100.00	17.02	4.80	254.80	3.05		1
M1	1, 5	29954	65.47	2.29	2.03	49.17	2.05		1
M2	5, 991	15871	34.69	44.76	24.28	145.47	21.10		5

**D**

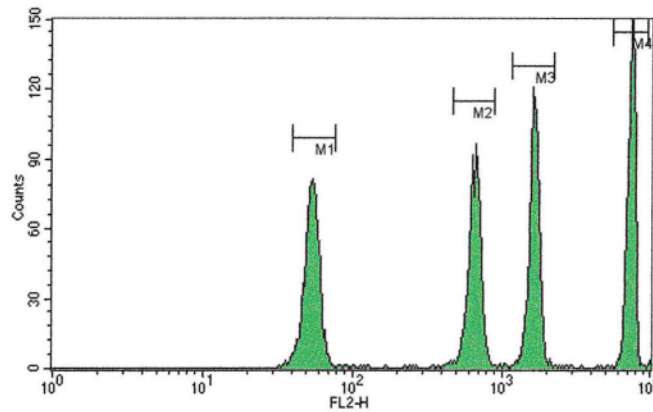
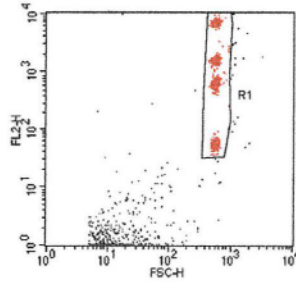
Gated Events: 40664      Total Events: 50000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 991	40664	100.00	23.79	8.23	227.71	6.98		1
M1	1, 5	17446	42.90	2.74	2.43	46.14	2.57		1
M2	5, 991	23332	57.38	39.45	20.43	170.81	15.82		7



Figure 15

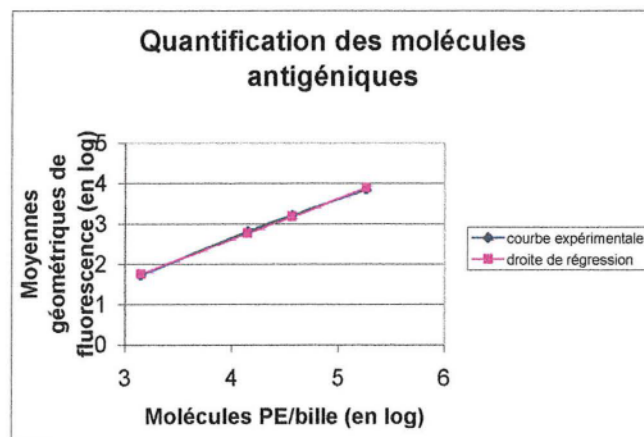
Standardisation de l'intensité de fluorescence :  
les billes calibrées



Gated Events: 8462

Total Events: 10060

Marker	Left, Right	Events	% Gated	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 991	8462	100.00	2407.06	809.98	118.21	1345.57	7169
M1	40, 77	2047	24.19	53.66	53.38	10.12	53.28	53
M2	474, 898	2069	24.45	646.27	643.63	9.00	649.38	655
M3	1176, 2227	2076	24.53	1605.49	1601.08	7.39	1596.34	1582
M4	5523, 9475	2166	25.60	7126.32	7114.69	5.71	7169.17	7169



### II-1-3 Validation des réactifs

La première étape consiste à tester les réactifs choisis en utilisant des témoins positifs d'activation *in vitro*. La finalité est de pouvoir ensuite analyser les CPA avec ces réactifs.

Indépendamment du protocole d'évaluation défini par l'AFS, nous avons tenté d'explorer, en plus de la dégranulation alpha, la modification conformationnelle de la GPIIb/IIIa, la dégranulation lysosomale et la formation d'une surface procoagulante.

A partir d'une tubulure d'un CPA prélevé quelques minutes avant, une suspension plaquettaire à 300 G/l est préparée (dilution en PBS normal) puis mise en contact de différents agonistes.

#### II-1-3-1 Mesure de la modification conformationnelle de la GPIIb/IIIa

La GPIIb/IIIa sous forme activée peut lier l'anticorps PAC1. Pour tester cet anticorps, nous avons stimulé des plaquettes par l'ADP et expérimenté plusieurs conditions opératoires différentes.

1<sup>er</sup> mode opératoire : l'anticorps était mis en contact avec les plaquettes non fixées puis un lavage éliminait l'excès d'anticorps.

2<sup>e</sup> mode opératoire : l'ajout de l'anticorps aux plaquettes était suivi d'une fixation au PF 1 % pendant 2 heures à 4°C sans lavage ultérieur (conditions opératoires préconisées par BD).

3<sup>e</sup> mode opératoire : nous avons fixé les plaquettes au PF 1 % pendant 10 minutes avant de les mettre en contact avec PAC1.

Les expériences ont été réalisées à partir de différentes dilutions initiales des plaquettes dans du PBS, avec 2 lots d'anticorps PAC1 différents.

Pour les trois types d'essai, nous n'avons pas obtenu de marquage avec PAC1. Cet anticorps n'a donc pas été utilisé ultérieurement.

#### II-1-3-2 Mesure de la dégranulation alpha

Lorsque la membrane des granules alpha fusionne avec la membrane plasmique, le nouvel antigène CD62P est exprimé sur la membrane externe et peut être détecté par un anticorps.

##### *II-1-3-2-1 Concernant la validation de l'anticorps*

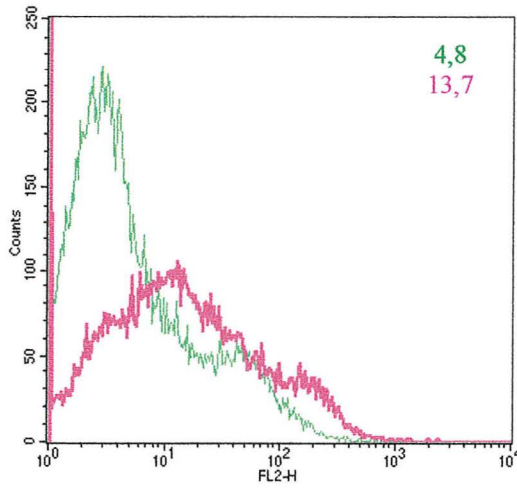
Le choix de l'anticorps anti-CD62P marqué à la phycoérythrine a été déterminé par comparaison entre deux anticorps commercialisés par deux sociétés différentes : Immunotech et BD, sur 4 concentrés plaquettaires à J5. **Figure 16**

L'anticorps BD choisi présentait une intensité de fluorescence supérieure. La moyenne géométrique de fluorescence totale moyenne pour les 4 échantillons étudiés est de 10,7 pour BD et 4,0 pour Immunotech.

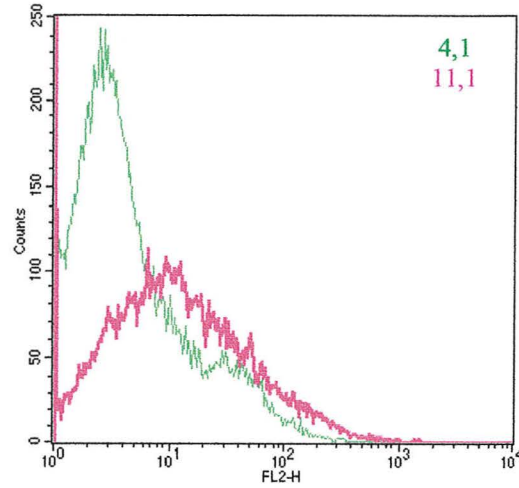
De plus, le réactif BD nous permettait d'utiliser en parallèle les billes de quantification commercialisées par BD.

Figure 16

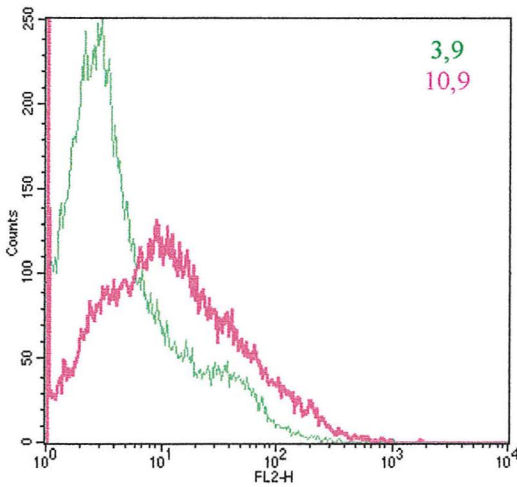
Comparaison de deux anticorps anti-CD62P  
Immunotech et Becton Dickinson  
sur 4 échantillons issus de 4 CPA



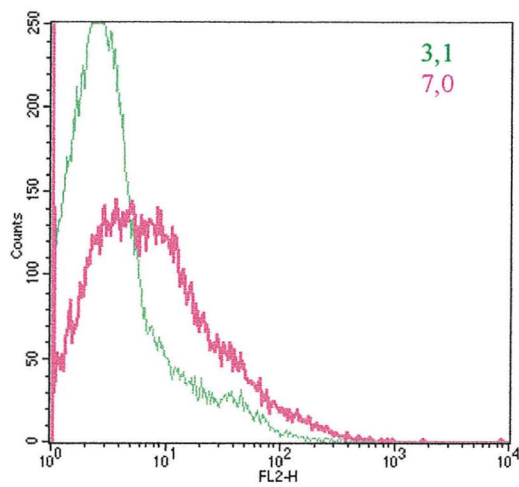
Echantillon plaquettaire 1



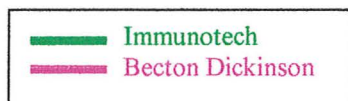
Echantillon plaquettaire 2



Echantillon plaquettaire 3



Echantillon plaquettaire 4



Les chiffres indiqués sont les résultats de la moyenne de fluorescence de l'échantillon.

FL<sub>2</sub> : fluorescence de l'anticorps anti-CD62 conjugué à la phycoérythrine

Le volume d'anticorps préconisé a été contrôlé de manière à obtenir les conditions d'excès d'anticorps pour  $1.10^6$  plaquettes. Le mode opératoire choisi précise qu'un lavage doit éliminer ensuite cet excès.

Sept tubes contenant la même quantité de plaquettes mais des volumes d'anticorps anti-CD62P différents ont été analysés en cytométrie. Face aux résultats résumés **Figure 17**, le volume choisi est de 20  $\mu$ l car il correspond à la moyenne de fluorescence maximale obtenue (85,7) avec des volumes étudiés compris entre 1 et 50  $\mu$ l d'anticorps.

Comme le montre la **Figure 18**, nous mettons en évidence la fusion de la membrane des granules alpha avec la membrane plasmique : 60 % de plaquettes CD62P<sup>+</sup> après stimulation par la PMA et 30 % après stimulation par l'ADP.

L'anticorps nous apparaît donc approprié pour apprécier la dégranulation alpha.

#### *II-1-3-2-2 Optimisation des conditions opératoires*

##### ♦ Quelle est l'influence de la fixation ?

Lors de l'activation plaquettaire par des agonistes, la reproductibilité parfaite des conditions opératoires était difficile à mettre en œuvre (volume variable de la prise d'essai initiale, température du laboratoire inconstante, indisponibilité possible du cytomètre ou de la centrifugeuse,...). Nous avons donc fixé les plaquettes dans du PF à 1 % dès la fin des 5 minutes de contact avec l'ADP. La proportion de plaquettes activées est moindre pour l'échantillon fixé par rapport à l'échantillon non fixé (70 % versus 86 %) mais le nombre moyen de molécules CD62/plaquette est supérieur à la surface des plaquettes fixées (1638 versus 1371).

113 échantillons plaquettaires issus des poches ont été analysés en comparant le pourcentage de plaquettes CD62P<sup>+</sup> et la moyenne géométrique de fluorescence, avec et sans fixation. Pour les deux paramètres mesurés, un test de Student pairé indique que ces résultats sont différents ( $p < 3.10^{-9}$ ). Les valeurs obtenues sont supérieures de 10 % en moyenne pour les échantillons non fixés. Les résultats obtenus sont corrélés ( $r^2 = 0,8$  pour le pourcentage de CD62P<sup>+</sup> et pour la moyenne de fluorescence, avec  $p < 0,0001$ ). Les droites de corrélation sont représentées **Figure 19**.

Pour le protocole d'évaluation des CPA, nous avons choisi de fixer les plaquettes avant le marquage afin de nous affranchir d'une activation plaquettaire artéfactuelle *in vitro*.

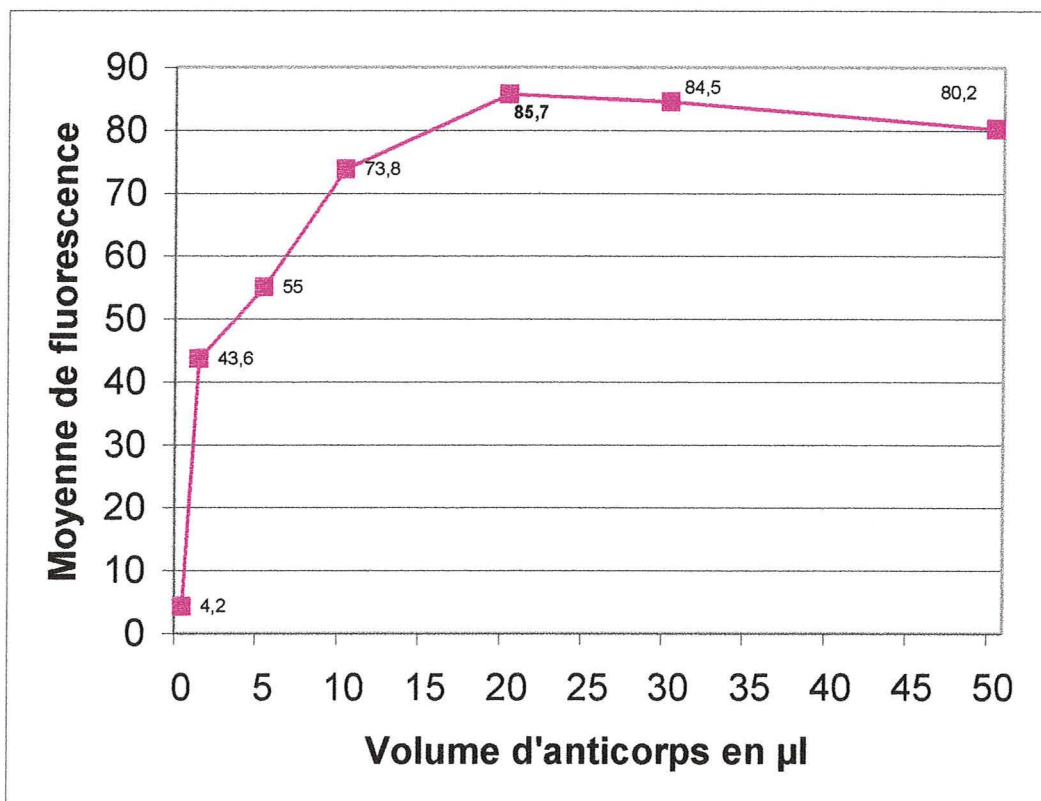
##### ♦ Quelle est l'influence de la durée de conservation des tubes avant analyse ?

Face à la possibilité d'aléas techniques lors de la mise en œuvre de cette étude de l'activation plaquettaire en routine, nous nous sommes interrogés sur la possibilité de délais d'attente possibles avant l'acquisition en cytométrie. Nous avons donc fixé plusieurs échantillons plaquettaires issus de 4 CPA et nous les avons conservés à température ambiante ou à 4°C, pendant 24h, 48h et une semaine.

Les résultats sont schématisés sur la **Figure 20**.

**Figure 17**

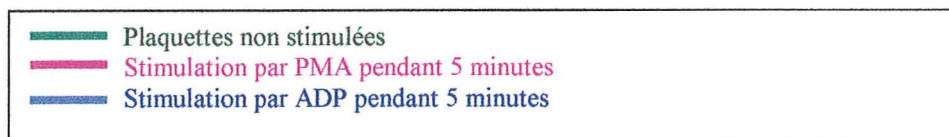
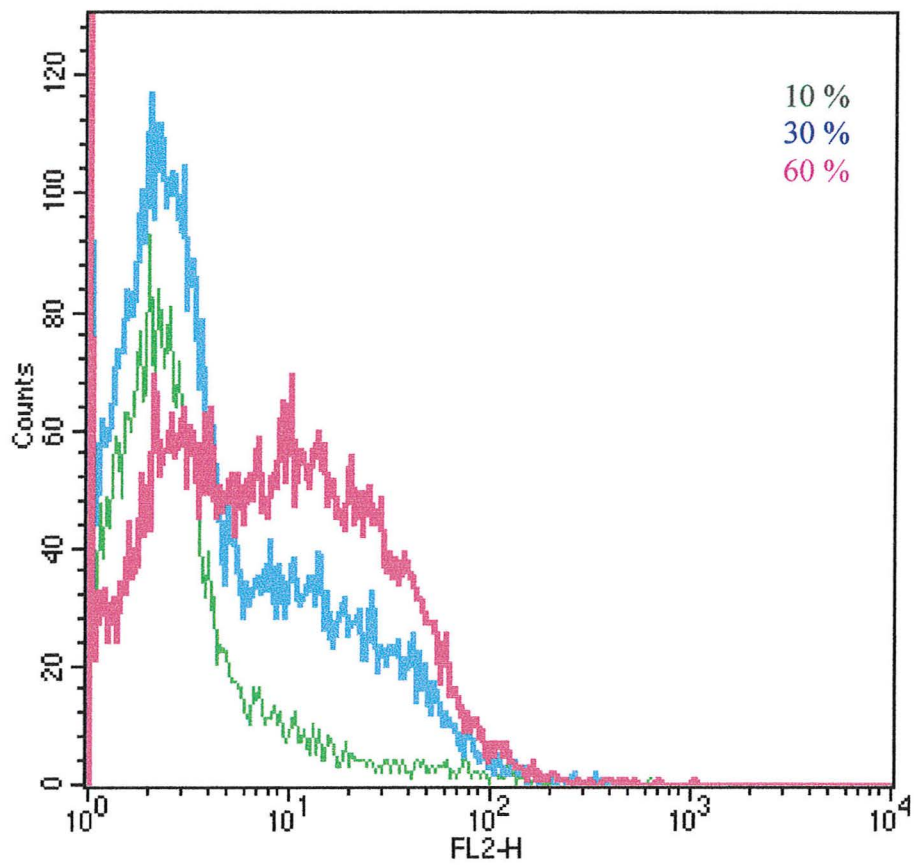
**Courbe de saturation  
de l'anticorps anti-CD62P (Becton Dickinson)**



7 suspensions plaquettaires issues d'un même CPA, activées par l'ADP (concentration finale de 5  $\mu\text{mol/l}$  pour une suspension à 300 G/l) pendant 5 minutes puis fixées en PF à 1% avant marquage (volumes d'anticorps variables).

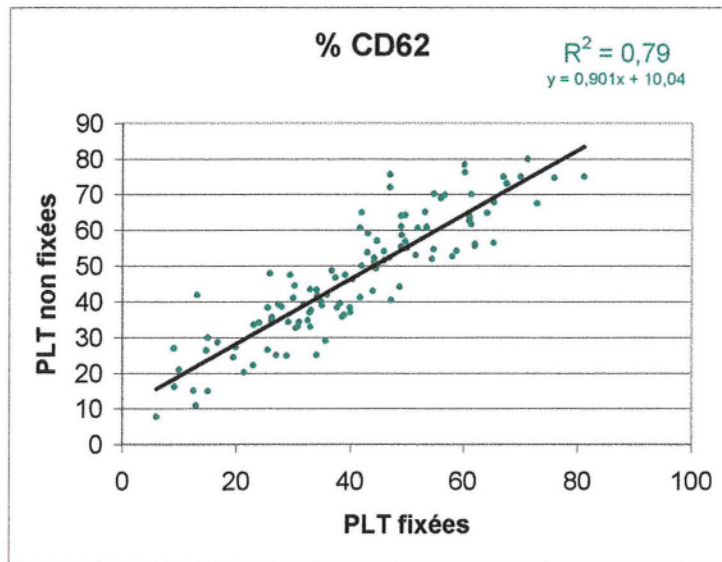
**Figure 18**

**Expression du CD62P membranaire  
après stimulation avec ADP ou PMA**

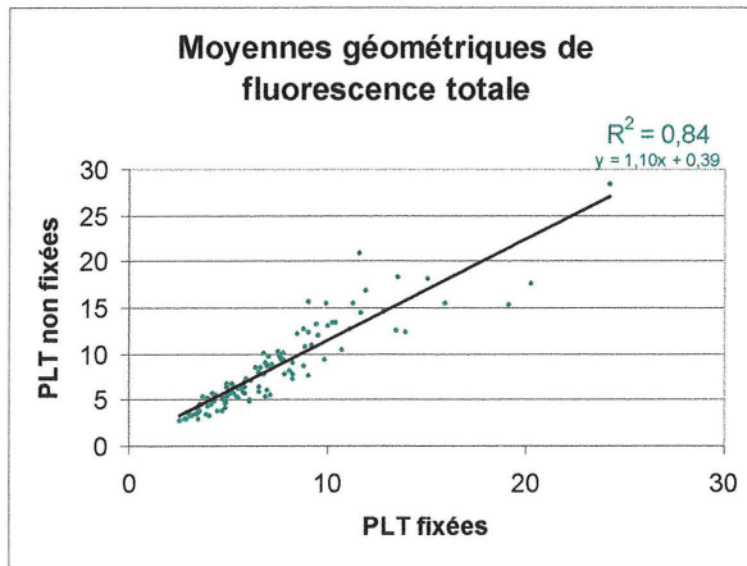


**Figure 19**

**Influence de la fixation  
sur l'expression de CD62P membranaire  
(relations linéaires positives)**



$p < 0,000 1$



$p < 0,000 1$

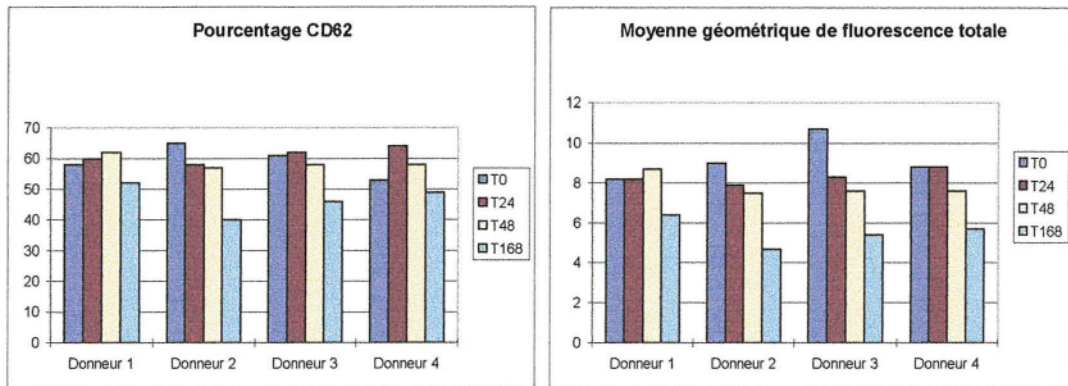
Résultats de 113 échantillons.



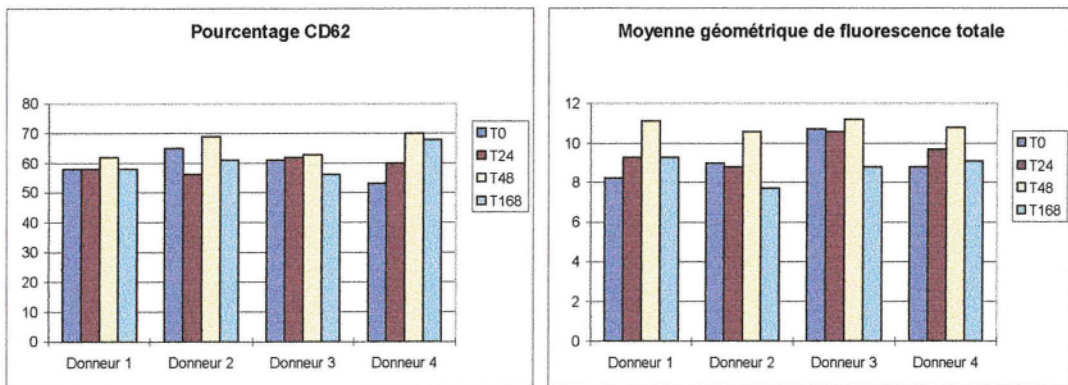
**Figure 20**

**Conservation des plaquettes de 4 donneurs dans le PF**

1) Plaquettes conservées à température ambiante



2) Plaquettes conservées à 4°C





Nous avons observé que la conservation optimale des plaquettes dans le PF pouvait se dérouler indifféremment à 4°C ou à température ambiante, dans un délai maximal de 48 heures. Les variations de la proportion de plaquettes activées et de l'expression de CD62P à leur surface sont inférieures à 10 % en moyenne pendant ce délai.

Mais, après une semaine de conservation à température ambiante, la moyenne géométrique de fluorescence totale et le pourcentage de plaquettes activées diminue de manière plus importante (40 % et 23 % respectivement). En revanche, comme ces variations ne sont que de 4 % et 8 % en moyenne lorsque les plaquettes sont placées à 4°C, la conservation peut se prolonger jusqu'à une semaine dans ces conditions.

L'étape suivant la fixation est le marquage. Dans le cas où l'expérience devrait être interrompue au stade de plaquettes fixées et marquées (problème de disponibilité du cytomètre), les tubes ne peuvent pas être conservés 24 heures (**Figure 21a**) car le pourcentage de plaquettes marquées, sur 4 échantillons, diminue de moitié. Mais nous avons toléré un délai de 2 heures car la variation moyenne du pourcentage de plaquettes activées est inférieure à 3 % (**Figure 21b**).

#### II-1-3-3 Mesure de la dégranulation lysosomale

L'antigène CD63 est exprimé par la plaquette si la membrane des lysosomes a fusionné avec la membrane plasmique.

Le choix de l'anticorps anti-CD63 était conditionné par sa conjugaison à l'isothiocyanate de fluorescéine. Le fluorochrome FITC (lecture en FL<sub>1</sub>) nous aurait permis ultérieurement un double marquage avec CD62-PE (détectée en FL<sub>2</sub>). Après stimulation par la thrombine, suivie ou non d'une fixation, nous n'avons pas détecté de plaquettes CD63<sup>+</sup>.

Ce marquage n'a pas été réalisé sur les échantillons issus des CPA du protocole.

#### II-1-3-4 Mesure de l'expression de la phosphatidylsérine

L'activation plaquettaire induit un flip-flop membranaire responsable de l'expression de phospholipides anioniques, dont la phosphatidylsérine, à la surface externe de la plaquette. La molécule de PS peut être mise en évidence par l'Annexine-V FITC.

Ce marquage a été mis au point à partir de suspensions plaquettaires issues de différents CPA.

##### *II-1-3-2-1 Optimisation des conditions opératoires*

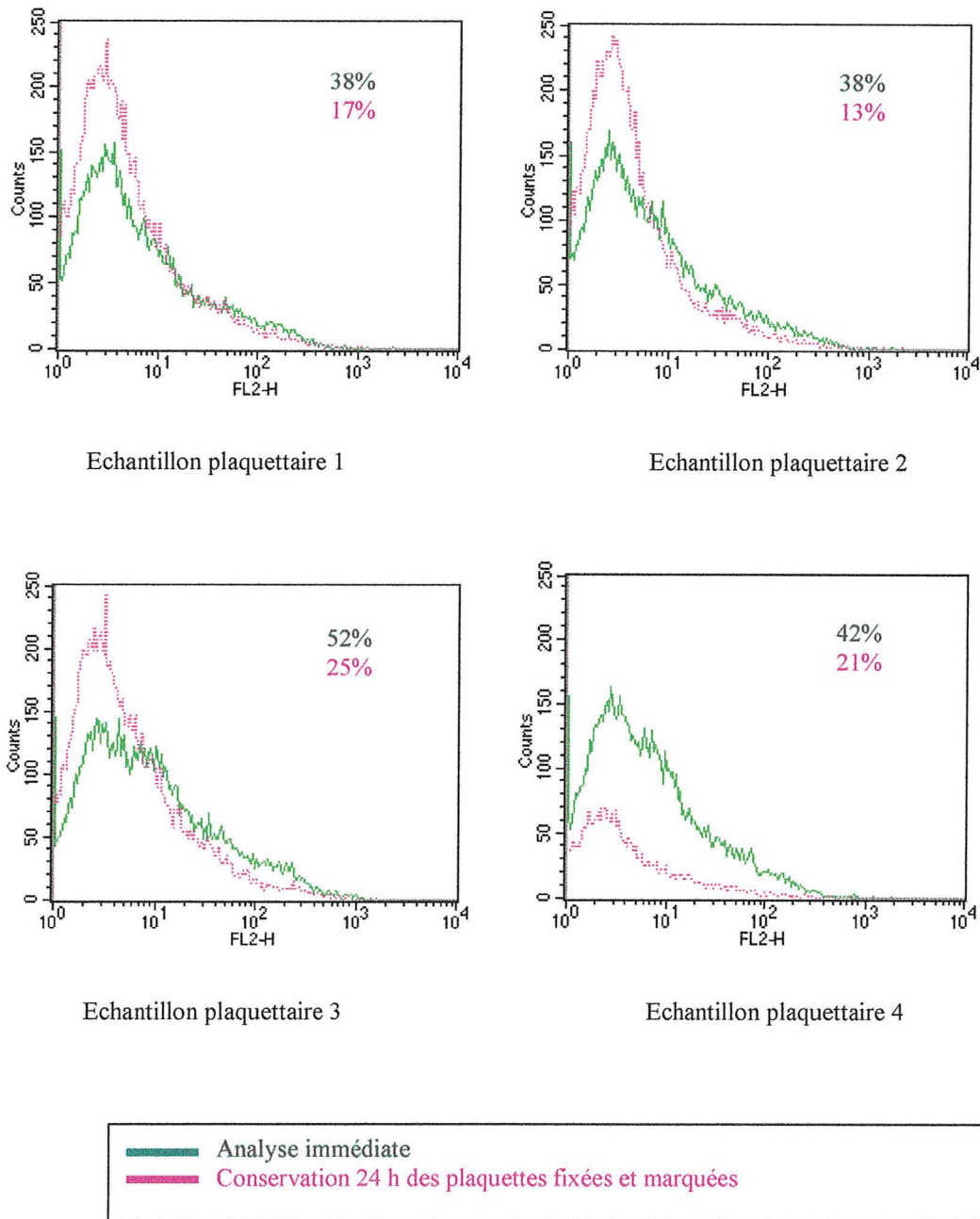
###### ♦ Influence des lavages à froid

La révélation de la PS sur plaquettes fixées est impossible car le PF permet l'accessibilité des molécules de PS à l'Annexine-V (**51**).

Les lavages à froid habituellement mis en œuvre pour ce marquage entraînent la disparition de 90 % des plaquettes dans la fenêtre d'acquisition habituelle (FSC/SSC). Ces plaquettes sont dispersées et ne forment plus un nuage de points homogène. Ces étapes de lavage ont donc été supprimées et les plaquettes en suspension dans le PBS sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> sont directement mises en contact avec l'Annexine-V.

Figure 21a

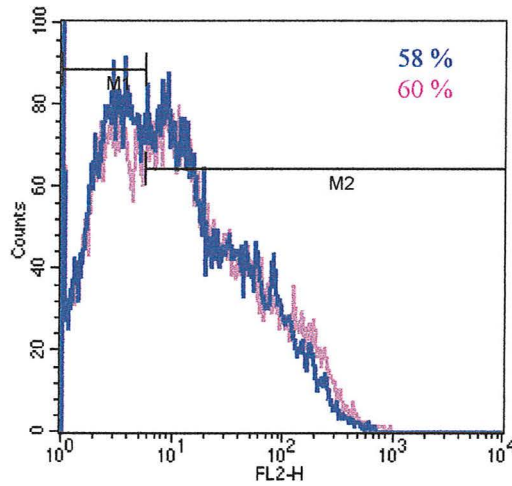
**Influence du délai avant l'analyse  
de plaquettes fixées et marquées**



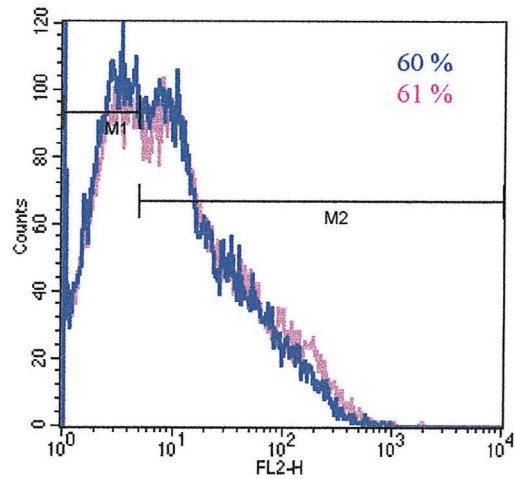
FL<sub>2</sub> : fluorescence de l'anticorps anti-CD62 conjugué à la phycoérythrine

Figure 21b

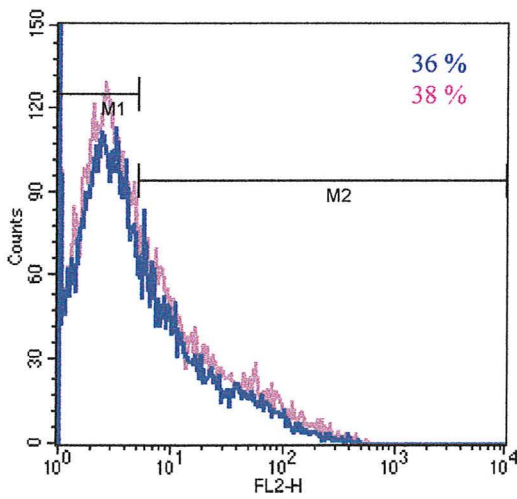
Influence du délai avant l'analyse  
de plaquettes fixées et marquées



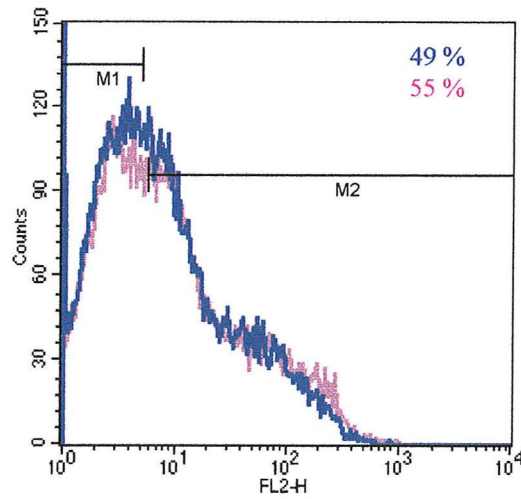
Echantillon plaquettaire 1



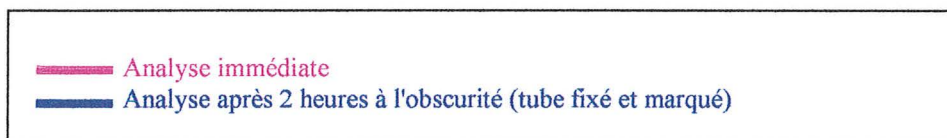
Echantillon plaquettaire 2



Echantillon plaquettaire 3



Echantillon plaquettaire 4



FL<sub>2</sub> : fluorescence de l'anticorps anti-CD62P conjugué à la phycoérythrine

♦ Influence de la température de marquage

Il n'a pas été observé de différence pour le pourcentage de plaquettes Annexine-V<sup>+</sup>, que l'incubation à l'obscurité ait lieu à 4°C ou à température ambiante.

TABLEAU XII  
INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION  
SUR LE POURCENTAGE DE PLAQUETTES ANNEXINE<sup>+</sup>

Echantillon	Température ambiante	4°C
1	3 %	3 %
2	3 %	3 %
3	3 %	3 %
4	5 %	4 %

♦ Influence du délai de conservation après marquage

La durée de l'incubation a été précisément contrôlée pour évaluer l'effet d'une attente avant l'acquisition en cytométrie sur l'augmentation de la liaison de l'Annexine-V aux plaquettes ; celle-ci apparaît modeste dans les deux premières heures (< 8 %) et plus importante dans un cas seulement à la quatrième heure (on passe de 6 % à 97 %).

TABLEAU XIII  
INFLUENCE DE LA DUREE D'INCUBATION  
SUR LE POURCENTAGE DE PLAQUETTES ANNEXINE<sup>+</sup>

Echantillon	Incubation de 10 min	Incubation de 2 h	Incubation de 4 h
1	6 %	13 %	97 %
2	4 %	6 %	13 %
3	4 %	6 %	11 %
4	4 %	7 %	7 %

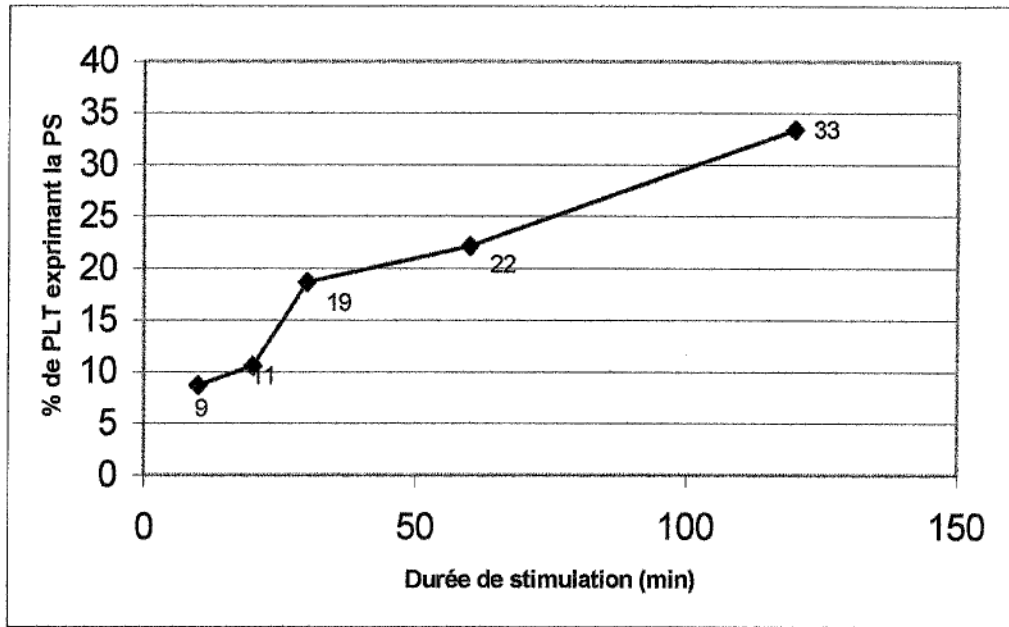
*II-1-3-2-2 Modèles de stimulation in vitro*

Nous avons vérifié que des plaquettes Annexine-V<sup>+</sup> pouvaient bien être détectées dans différents systèmes d'activation. Nous avons obtenu environ 8 % de plaquettes marquées après stimulation par l'ADP, 6 % après la thrombine, contrairement à la stimulation par la PMA qui n'a pas provoqué de flip-flop (même résultat que l'échantillon non stimulé). La durée de stimulation par l'ADP a également été testée et les résultats sont représentés **Figure 22**. Plus la durée de stimulation se prolonge, plus la proportion de plaquettes Annexine-V<sup>+</sup> augmente : de 9 % en 10 minutes à 33 % en 2 heures.

Devant les résultats satisfaisants obtenus avec le réactif Annexine-V FITC, nous avons décidé de l'utiliser sur les plaquettes issues des CPA.

**Figure 22**

**Influence de la durée de stimulation par l'ADP  
sur l'expression de la phosphatidylsérine membranaire**



Marquage Annexine-V  
(mesure sur le même échantillon plaquettaire)

## II-2 Résultats : activation plaquettaire dans les CPA (CMF)

### II-2-1 CD62P

Nous avons étudié l'expression du CD62P membranaire après fixation des plaquettes des 60 CPA, à J0, J3 et J5.

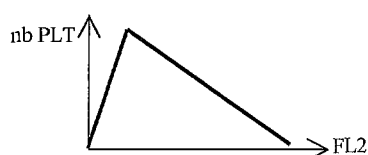
#### II-2-1-1 Description des profils

Les histogrammes de fluorescence sont très différents d'un donneur à l'autre mais également pour un même donneur si on compare ses 2 dons.

La **Figure 23** montre deux cinétiques obtenues à partir de deux profils d'activation très différents, pourtant issus de 2 CPA du même donneur.

Au cours de cette étude, nous avons pu observer deux types de profils (schématisés de manière simplifiée):

Le premier profil est le plus fréquent :



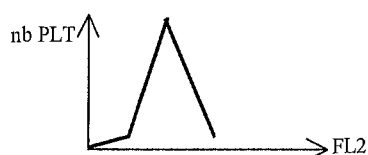
En mélange avec des plaquettes non activées, il existe une population plaquettaire faiblement activée (épaulement à droite sur l'histogramme de fluorescence).

Le deuxième profil est le suivant :



Deux populations plaquettaires homogènes coexistent : une qui n'est pas activée et une autre avec des plaquettes exprimant le même nombre moyen de molécules CD62P. Parfois un troisième pic est visible, ce qui témoigne de la présence d'au moins deux sous-populations plaquettaires avec des niveaux d'activation différents.

*Il existe un troisième type de profil :*

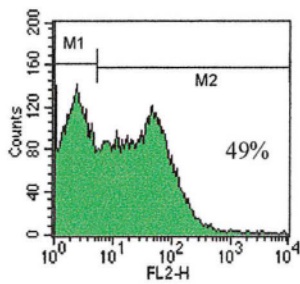


*Toute la population plaquettaire est activée de manière homogène ; c'est le cas des activations par agonistes uniquement.*

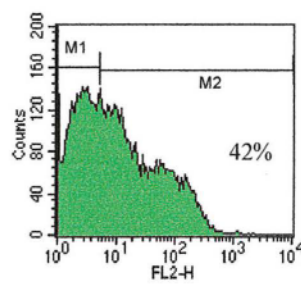
**Figure 23**

**Exemples d'expression du CD62P membranaire  
à J0, J3 et J5  
pour 2 CPA issus du même donneur**

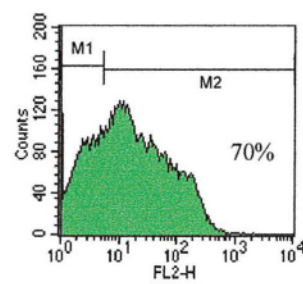
**Version 5.1**



**J0**

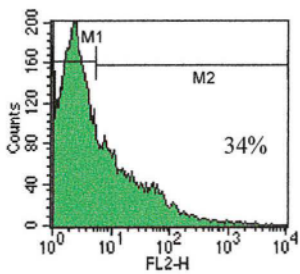


**J3**

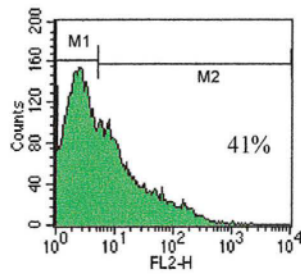


**J5**

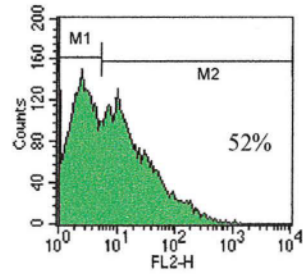
**Version TURBO**



**J0**



**J3**



**J5**

Cette diversité des profils est apparue dans notre étude indépendante du type de version du séparateur (5.1 ou Turbo).

### II-2-1-2 Activation après la procédure de séparation (J0)

#### ♦ Pourcentage de CD62P

On retrouve en moyenne 30 % de plaquettes activées à J0 mais les CPA étudiés sont très différents (minimum 6 % et maximum 47 %). Le coefficient de variation du pourcentage de CD62P<sup>+</sup> (32 %) reflète cette grande disparité entre les échantillons, indépendamment du type de séparateur utilisé.

La présence d'agrégats n'est pas liée à des valeurs élevées ou faibles.

Le test pairé de Student fait apparaître une différence ( $p = 0,03$ ) entre la version 5.1 et la version Turbo. La proportion de plaquettes activées est moindre, en moyenne, pour la version Turbo mais cette différence est faible (27 % versus 31 %). Tableau XIV.

#### ♦ Moyenne de fluorescence du CD62P

On observe également une grande disparité des résultats concernant le nombre moyen d'antigènes exprimés par plaquette (reflété par notre rapport de fluorescence R). La moyenne de R est d'environ 10 mais les valeurs sont comprises entre 5 et 23 ; le coefficient de variation est de 30 %. Au risque alpha de 5 %, il n'y a pas de différence entre les deux modes de séparation ( $p = 0,11$ ). Tableaux XV et XVI.

Par ailleurs, la proportion de plaquettes activées est corrélée de manière exponentielle avec le nombre moyen de molécules CD62P exprimées ( $r^2 = 0,78$ ) **Figure 24**. A la sortie du séparateur, la proportion de plaquettes activées influence directement la moyenne de fluorescence obtenue.

### II-2-1-3 Activation au cours du temps

#### ♦ Pourcentage de CD62P

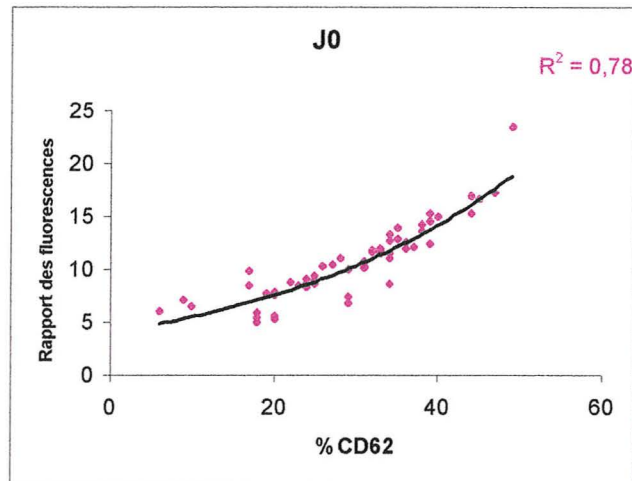
La proportion de plaquettes exprimant CD62P membranaire augmente progressivement de J0, J3 à J5 pour les 60 concentrés plaquettaires (31 %, 45 %, 58 % en moyenne pour 5.1 et 27 %, 42 %, 56 % en moyenne pour Turbo). A J5, la proportion maximale obtenue (81 %) concerne un CPA issu de la version 5.1 et la valeur minimale (30 %) est mesurée pour un CPA issu de la version Turbo. Néanmoins, le test de Student pairé ne met pas en évidence de différence entre les deux séparateurs ( $p > 0,1$ ) pour les pourcentages de plaquettes activées à J3 et J5. Tableau XIV.

D'une manière générale et indépendamment du type de séparateur, il existe une relation positive entre la proportion de plaquettes activées à J0 et celle de J3 ( $r^2 = 0,60$  avec  $p < 0,0001$ ). Plus le pourcentage est important à J0, plus le résultat obtenu à J3 sera élevé.

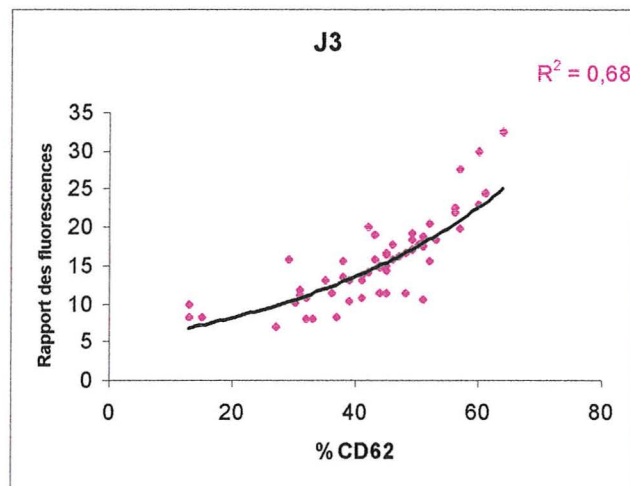


**Figure 24**

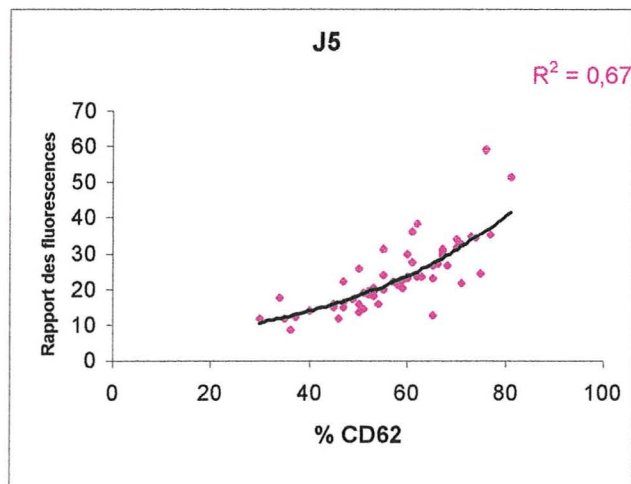
**Diagrammes de dispersion représentant le pourcentage de plaquettes activées et le nombre moyen de molécules CD62P à la surface des plaquettes**



$p < 0,0001$



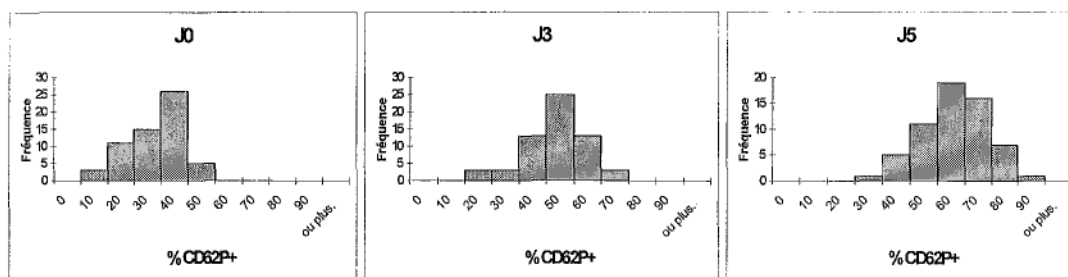
$p < 0,0001$



$p < 0,0001$

Ces variables sont peu liées si on prend en compte l'évolution globale de J0 à J5 ( $r^2 = 0,17$ ) ; l'activation mesurée à J5 fait probablement intervenir d'autres paramètres que le niveau d'activation à J0. **Figure 25.**

**Figure 26**  
**Répartition des fréquences (pourcentages de plaquettes activées) à J0, J3 et J5**



*Ces histogrammes visualisent la dispersion des valeurs et la progression au cours de la conservation : le pourcentage de plaquettes activées augmente progressivement.*

#### ♦ Moyenne de fluorescence du CD62P

Les moyennes obtenues pour R évoluent de 16 à 25 pour 5.1 et de 15 à 22 pour Turbo, de J3 à J5. Les valeurs extrêmes (minimum et maximum) se retrouvent toutes les deux pour la version 5.1 (8,6 et 59,2 à J5). Il n'y a pas de différence statistique à J3 et J5 entre les CPA issus de Turbo et ceux issus de 5.1 ( $p > 0,11$ ).

Tableaux XV et XVI.

De la même manière que pour l'évolution de la proportion de plaquettes activées, il est possible d'obtenir une courbe de tendance ( $p < 0,0001$ ) de J0 à J3 ( $r^2 = 0,58$ ) et de J0 à J5 ( $r^2 = 0,40$ ). **Figure 25.**

Par ailleurs, nous avons observé qu'il existe également une relation de type exponentielle à J3 et J5 entre le pourcentage de CD62P<sup>+</sup> et l'intensité de fluorescence de l'échantillon ( $r^2 > 0,67$  avec  $p < 0,0001$ ). **Figure 24.**

#### II-2-2 Annexine-V

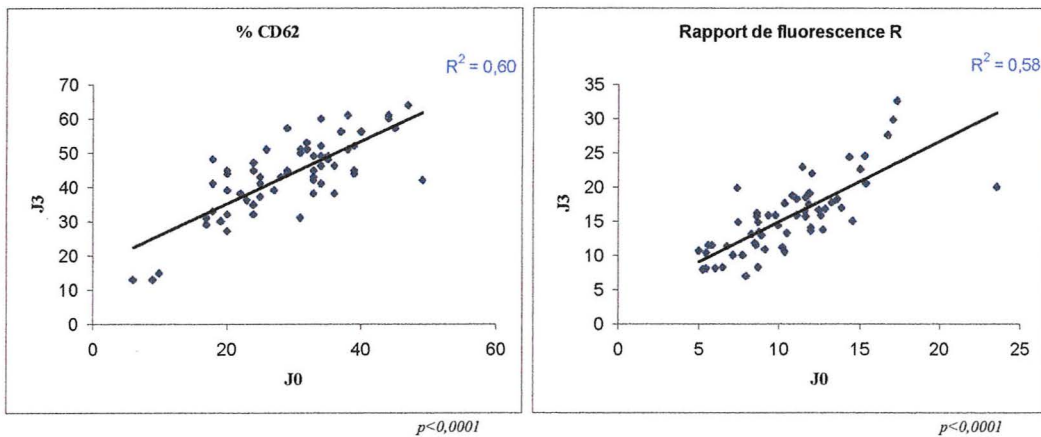
Pour différencier plus facilement les plaquettes Annexine-V<sup>+</sup> et Annexine-V<sup>-</sup> lors de l'analyse des résultats de CMF, nous n'avons pas utilisé la représentation en histogrammes mais celle en nuages de points : en abscisse, la taille des plaquettes et en ordonnée, la fluorescence FITC (FL<sub>1</sub>).

Un exemple est représenté **Figure 27.**

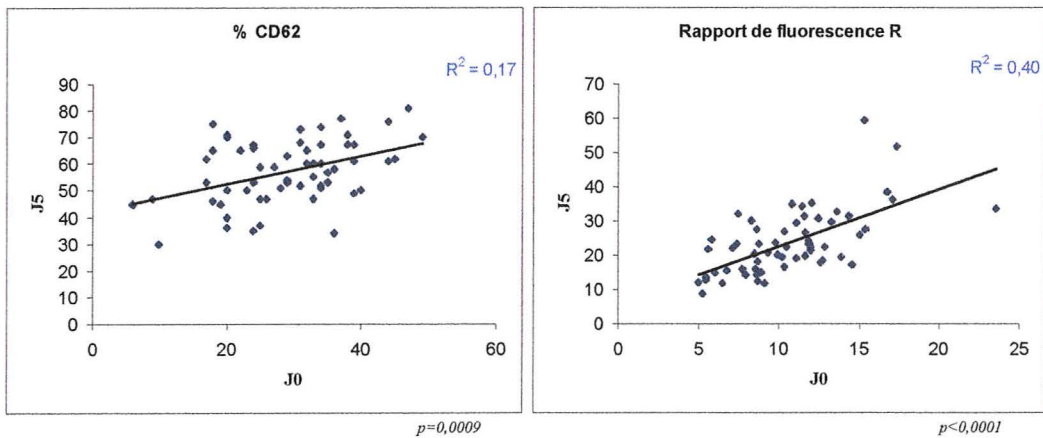
**Figure 25**

**Informativité du pourcentage de plaquettes activées  
et du rapport de fluorescence R à J0  
vis à vis des résultats de J3 et J5**

Concernant les résultats de J3

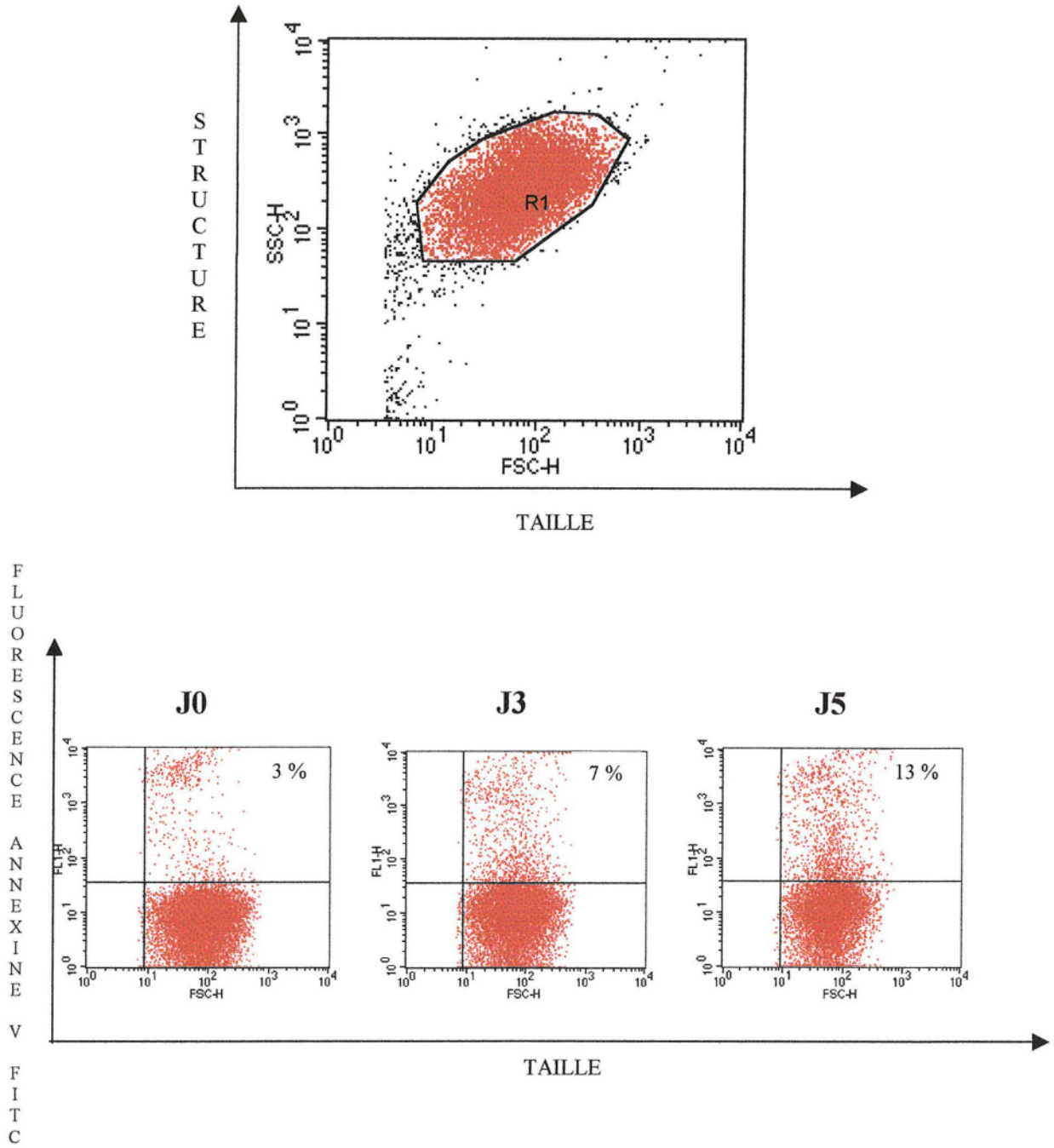


Concernant les résultats de J5



**Figure 27**

**Exemple d'un suivi de CPA à J0, J3 et J5  
Marquage à l'Annexine-V**



Le tableau XVII présente les résultats de 28 concentrés plaquettaires étudiés à J0, J3 et J5. Ici, l'étude n'est pas pairée car le marquage a été mis au point après le début du protocole. La proportion de plaquettes Annexine-V<sup>+</sup> reste modérée jusqu'à J5 (8 % en moyenne, 17 % au maximum) mais elle augmente progressivement au cours du temps (3 % à J0). Sur les 28 résultats obtenus, nous n'avons pas observé de différence entre les CPA 5.1 et Turbo pour l'expression d'une surface procoagulante au cours des 5 jours de conservation ( $p > 0,6$ ).

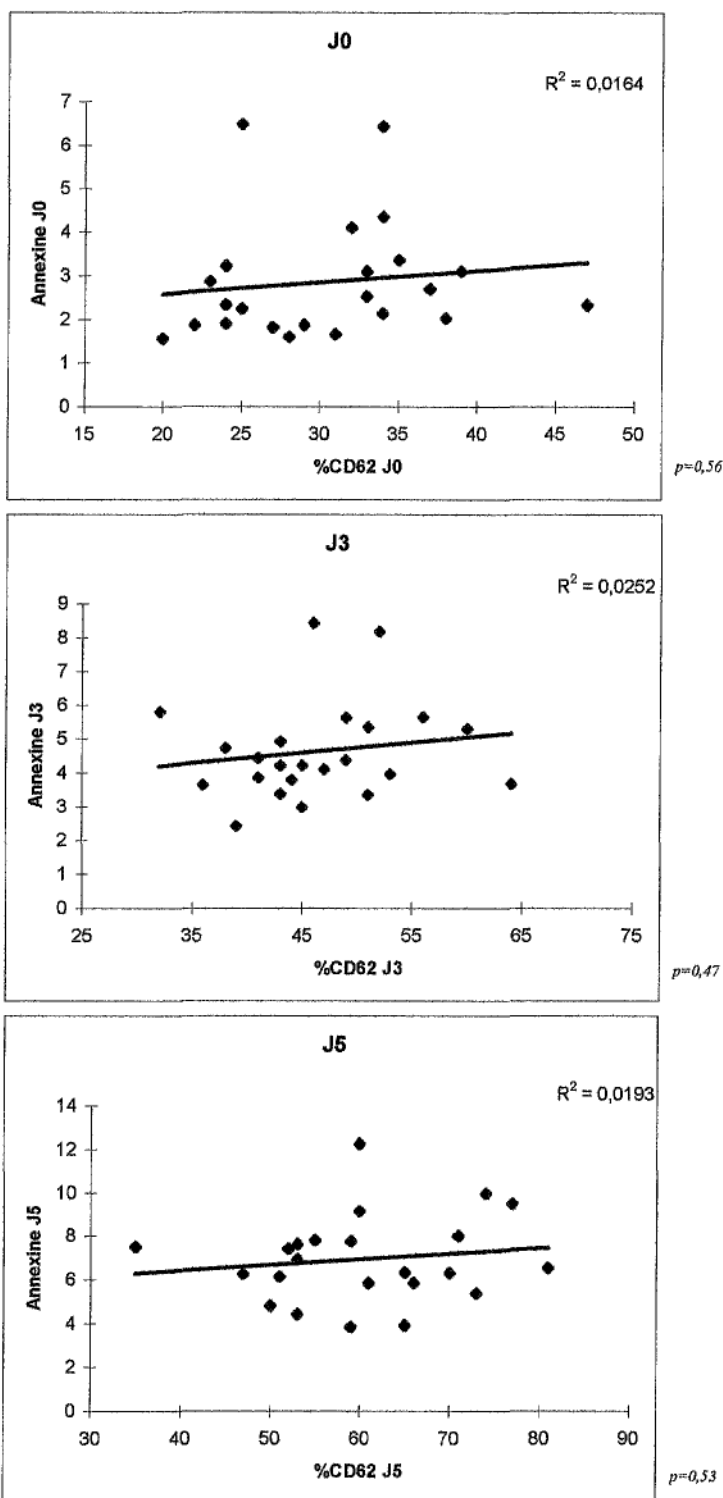
Par ailleurs, nous n'avons pas observé de corrélation entre la proportion de plaquettes concernées par le processus de dégranulation alpha (CD62P<sup>+</sup>) et celle qui subit le flip-flop membranaire, aux trois temps étudiés ( $r^2 < 0,03$ ). **Figure 28.**

Mais le nombre d'échantillons testés pour les deux marqueurs est faible ( $n = 23$ ).

**Figure 28**

**Diagrammes de dispersion liant les proportions de plaquettes CD62P+ d'une part et Annexine V+ d'autre part aux trois temps de l'étude**

(n = 23)



### III ETUDE DE L'ACTIVATION PLAQUETTAIRE PAR DOSAGE DE FACTEURS SOLUBLES

#### III-1 Préliminaires

- Nous avons mesuré la  $\beta$ TG dans le plasma de 4 donneurs, avant la cytophèrese (prélèvement de sang total sur Diatube H). Les résultats obtenus sont de 22 UI/ml. Le taux plasmatique de la  $\beta$ TG chez l'adulte est généralement compris entre 10 et 40 UI/ml.

- Nous avons comparé deux techniques d'échantillonnage : le Diatube H était placé dans la glace ou à température ambiante lors de son remplissage. Les conditions de centrifugation ultérieures étaient identiques.

Les résultats des dosages ELISA (Figure 29) pour les deux facteurs solubles sont comparables puisque la variation moyenne observée entre les deux modes opératoires à deux températures différentes est de 5,5 % pour la GMP140 et 7,7 % pour la  $\beta$ TG (12 échantillons comparés). Comme la continuité de la chaîne du froid était préconisée pour la  $\beta$ TG, nous avons choisi l'échantillonnage à froid.

#### III-2 Résultats pour les 60 CPA

Les 2 facteurs solubles :  $\beta$ TG et GMP140 ont été dosés à J0, J3 et J5 pour les 60 CPA.

Tableaux XVIIIa et XIX a.

La dégranulation alpha est reflétée par une augmentation progressive de ces deux marqueurs au cours du temps : de 6500 à 16500 UI/ml pour la  $\beta$ TG, de 120 à 300 ng/ml pour la GMP140 en moyenne.

**Figure 30**  
Répartition des résultats obtenus pour la  $\beta$ TG et la GMP140

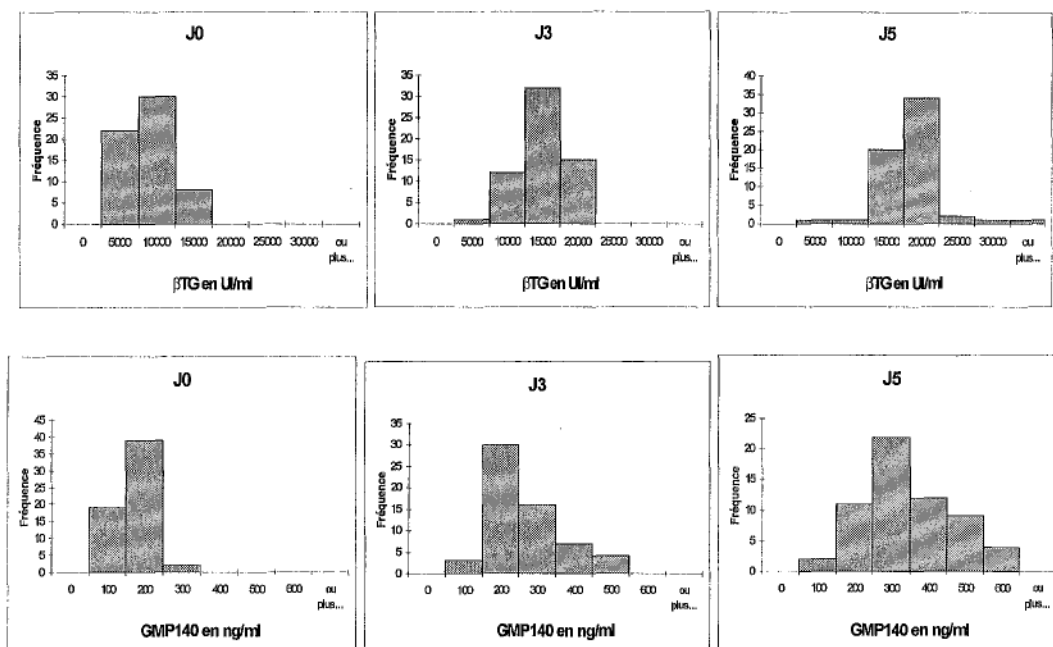
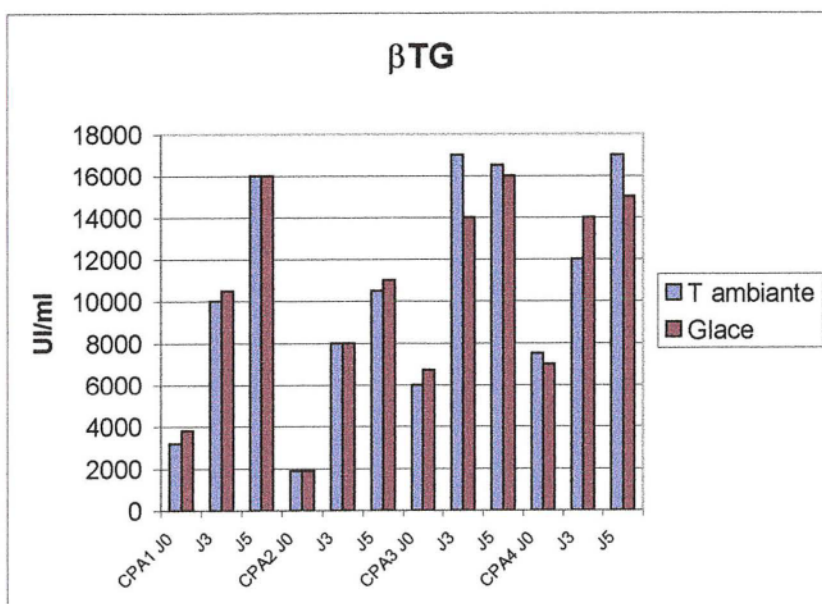
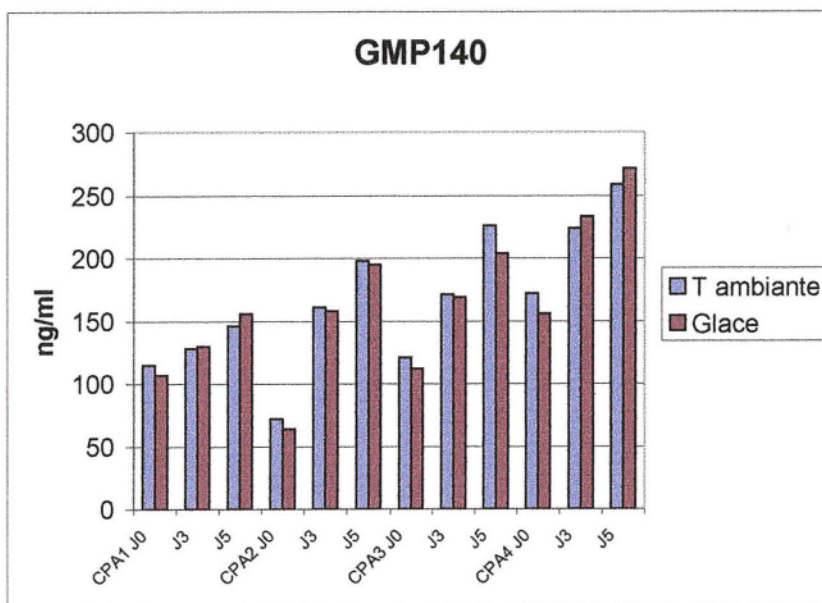


Figure 29

Influence du mode d'échantillonnage pour le dosage des facteurs solubles sur 4 CPA, à J0, J3 et J5





Il est difficile de comparer les valeurs d'un CPA à l'autre car les concentrations de plaquettes qu'ils contiennent sont différentes (quantité de plaquettes et volume de la poche variables d'un CPA à l'autre). Nous avons donc rapporté les valeurs obtenues (qui sont des concentrations) à la concentration plaquettaire du CPA. Les rapports moyens obtenus varient de 6 UI/10<sup>6</sup> plaquettes à 14 UI/10<sup>6</sup> plaquettes pour la  $\beta$ TG et de 0,12 ng/10<sup>6</sup> plaquettes à 0,26 ng/10<sup>6</sup> plaquettes pour la GMP140.

Le test de Student ne fait pas apparaître de différence ( $p > 0,5$ ) entre les deux versions pour ces deux dosages et ceci quelle que soit la durée de conservation des CPA (J0, J3 ou J5) Tableaux XVIIIb et XIXb.

On peut constater que le rapport le plus faible pour la GMP140 à J0 se retrouve pour le même donneur (91401456) lors de ses deux dons : 0,04 ng/10<sup>6</sup> plaquettes sur 5.1 et 0,06 ng/10<sup>6</sup> plaquettes sur Turbo. Mais on ne retrouve pas cette similitude pour la valeur maximale.

Pour chacun des deux paramètres, les valeurs de J3 et de J5 dépendent partiellement de celles de J0 ( $p < 0,000 1$ ) mais les coefficients de corrélation obtenus laissent supposer que le processus de dégranulation au cours du temps est le résultat d'un processus multifactoriel. Nous montrons toutefois que les résultats obtenus pour la  $\beta$ TG ( $r^2 = 0,56$  à J3 et  $r^2 = 0,44$  à J5) sont plus liés à ceux de J0 que ne le sont les résultats de la GMP140 ( $r^2 = 0,35$  à J3 et  $r^2 = 0,24$  à J5). **Figure 31.**

### III-3 Corrélations existant entre ces dosages de facteurs solubles et l'expression membranaire de CD62P

La **Figure 32** montre que les deux facteurs solubles semblent liés positivement entre eux aux trois temps de l'étude ( $p < 0,01$ ) mais la courbe de tendance obtenue montre qu'il s'agit de deux processus faiblement dépendants ( $r^2 < 0,36$ ).

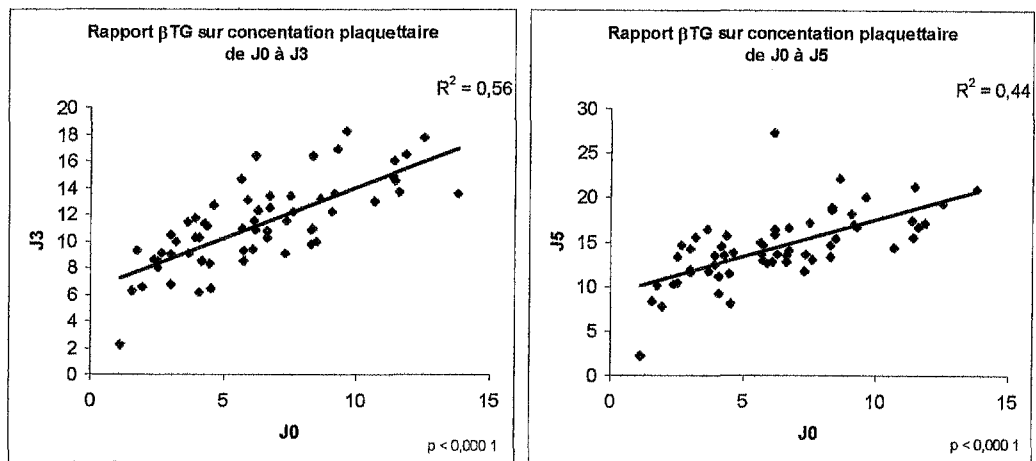
L'intensité de la sécrétion de  $\beta$ TG est liée à l'importance de l'expression membranaire de CD62P (pourcentage et fluorescence) jusqu'à J3 puisque la valeur du coefficient de détermination est supérieure à 0,44 ( $p < 0,000 1$ ). Cette tendance s'affaiblit à J5 ( $r^2 < 0,29$ ). **Figure 33**

Quant à la sécrétion de GMP140, elle n'est ni proportionnelle ni inversement proportionnelle à l'expression de CD62P, aux trois temps de l'étude ( $r^2 < 0,21$ ). **Figure 34**

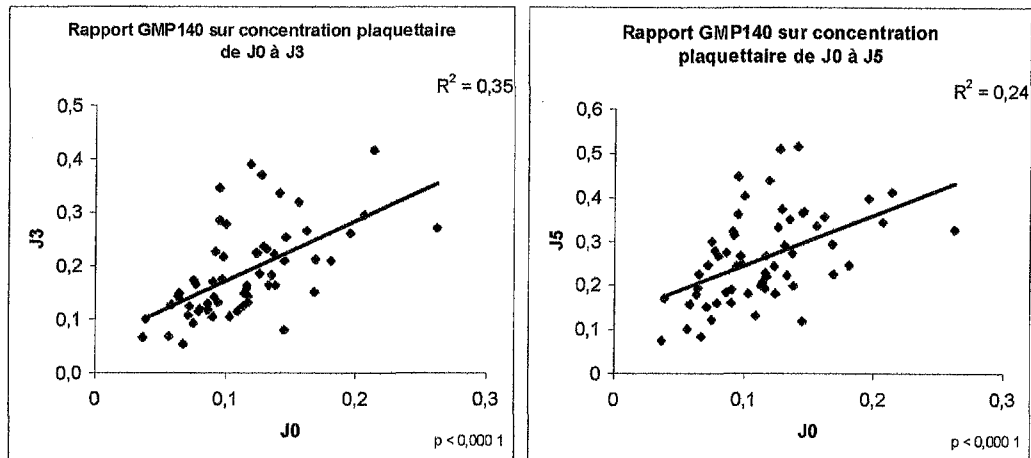
### Figure 31

## Informativité de la valeur des dosages de facteurs solubles à J0

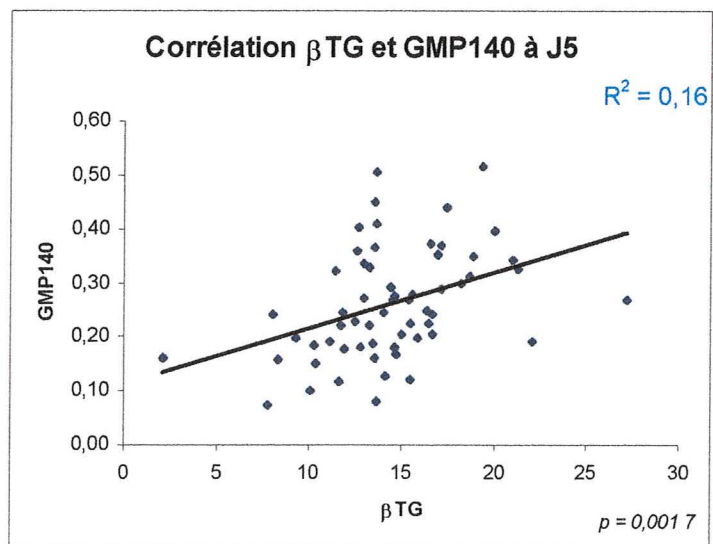
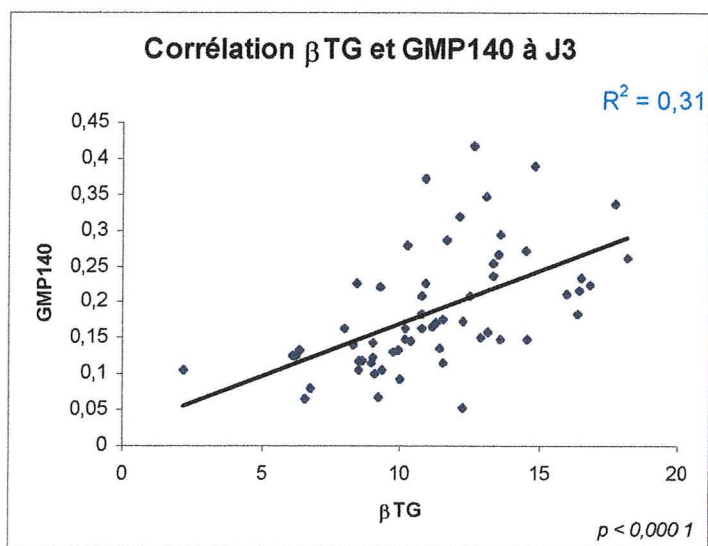
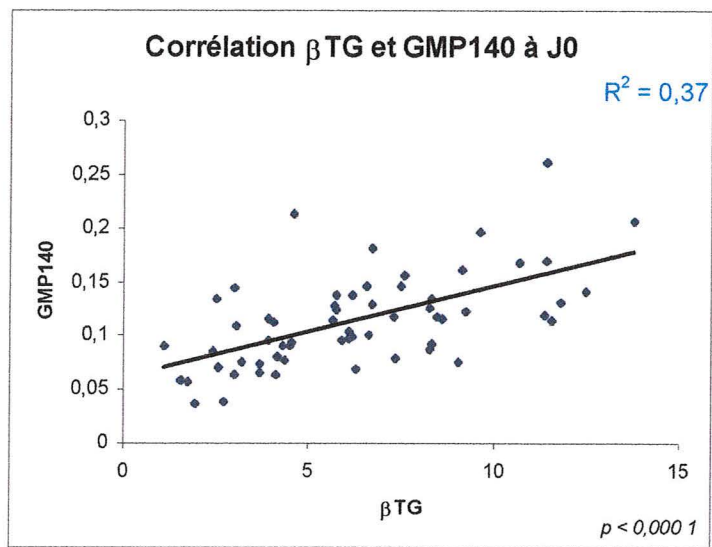
### Rapport $\beta$ TG sur concentration plaquettaire



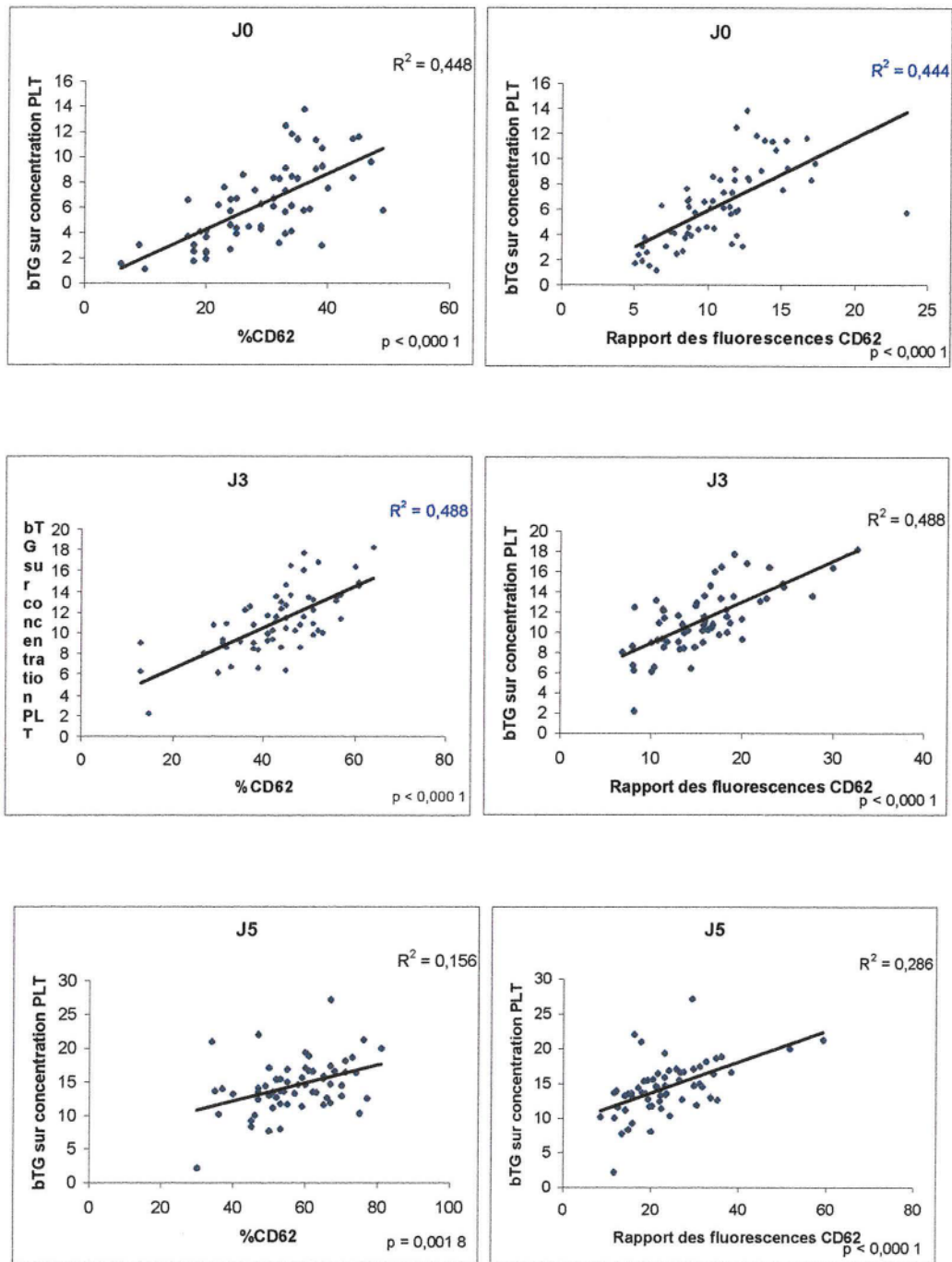
### Rapport GMP140 sur concentration plaquettaire



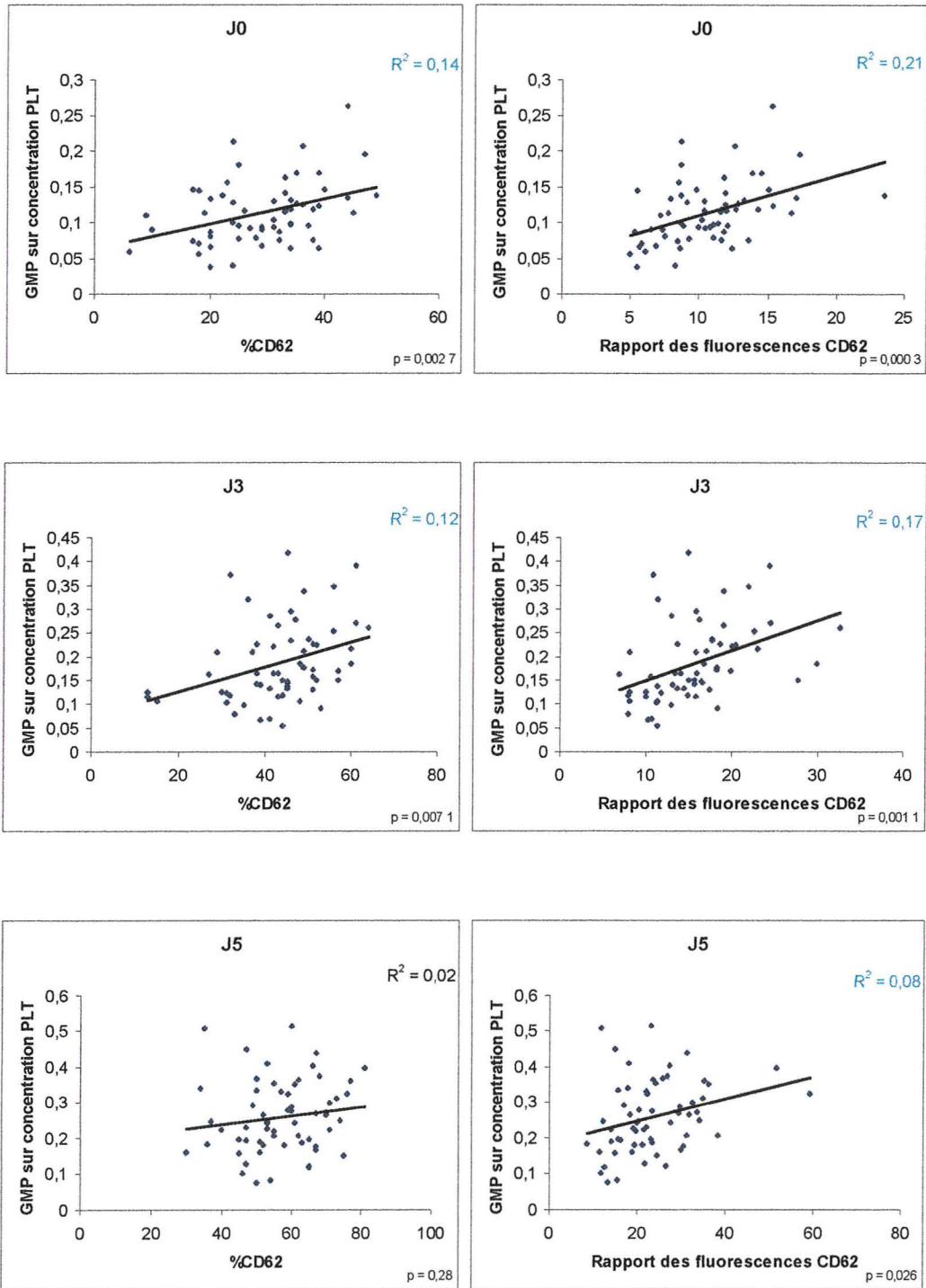
**Figure 32**  
**Diagrammes de dispersion des valeurs des deux facteurs solubles**  
**à J0, J3 et J5**



**Figure 33**  
**Diagrammes de dispersion concernant l'expression de CD62P**  
**membranaire (% et moyenne de fluorescence)**  
**et la sécrétion de  $\beta$ TG**



**Figure 34**  
**Diagrammes de dispersion concernant l'expression de CD62P**  
**membranaire (% et moyenne de fluorescence)**  
**et la sécrétion de GMP140**



## IV TESTS MORPHOLOGIQUES

### IV-1 Indice de tournoiement

56 CPA ont un indice de tournoiement de 3 (très bon) pendant la durée de l'étude. Seules les poches des donneurs 82226081 (lors des 2 dons) 84501854 (5.1) et 82071973 (Turbo) ont un indice de tournoiement évalué à 2 à partir de J3 ou J5. Dans un autre contexte (hors protocole), ces produits auraient été distribués.

### IV-2 VPM

Les plaquettes issues de la version Turbo ont en moyenne un plus grand VPM (7,13 fl) que celles de la version 5.1 (6,91 fl). Le test païré souligne cette différence aux trois temps de l'étude ( $p < 0,005$ ). Tableau XX

Nous avons également suivi l'évolution de la concentration plaquettaire dans les CPA : elle est d'environ 1000 G/l avec un maximum à J3 par rapport à J0 et J5. Tableau XXI.

Le CPA du donneur 85521327 sur la version Turbo contient des plaquettes dont le VPM est de 9,50. La présence d'amas plaquettaires visibles à l'œil a été notée dans cette poche.

Les plaquettes issues des deux séparateurs ont une variation similaire de leur VPM de J0 à J3 (diminution moyenne de 2 à 3 %) puis de J3 à J5 (augmentation moyenne de 1 %) car les valeurs de p obtenues sont de 0,40 de J0 à J3 et 0,76 de J3 à J5. Tableaux XXII et XXIII.

## V TESTS REFLETANT LE METABOLISME PLAQUETTAIRE

### V-1 pH

Tableau XXIV.

Le pH initial est proche, en moyenne, du pH plasmatique (7,33) puis atteint la valeur de 7,17 en moyenne à J3 et 7,04 à J5. On observe donc une diminution moyenne de 0,3 unité de J0 à J5. Cette baisse progressive est constatée dans tous les cas (60 CPA) et la progression est similaire entre les deux versions ( $p > 0,40$ ).

Toutes les valeurs obtenues sont dans les normes (précision à 0,05 unité près).

### V-2 glucose

Tableau XXV.

Le glucose est apporté avec la solution anticoagulante lors de la cytophèrese. Il est progressivement métabolisé par les plaquettes au cours de la conservation. Il n'y a pas de différence significative entre les deux versions pour la consommation de glucose de J0 à J5, ( $p > 0,4$ ). Les moyennes obtenues sont de 16,5 ( $\pm 4,1$ ) à 10,7 ( $\pm 3,6$ ) mmol/l pour la version 5.1 et de 15,9 ( $\pm 4,0$ ) à 10,2 ( $\pm 3,3$ ) mmol/l pour la version Turbo.

## VI TEST REFLETANT LA LYSE DES PLAQUETTES : LA LDH

L'activité enzymatique mesurée reste proche des valeurs normales plasmatiques (138 à 276 UI/l). A J0 (moyenne de 183 UI/l), J3 (moyenne de 208 UI/l) et J5 (moyenne de 241 UI/l) ; la lyse plaquettaire semble faible. Tableau XXVIa.

Les prélèvements issus des donneurs 82378934 et 82924330 présentent une concentration en LDH supérieure à la moyenne ( $> 270$  UI/l à J5) mais cette particularité se retrouve sur les deux versions et dès J0. Elle pourrait être due à une concentration anormalement élevée de la LDH plasmatique pour ces deux donneurs.

La **Figure 35** souligne l'informativité du dosage de LDH à J0 qui détermine partiellement les valeurs de J3 ( $r^2 = 0,5$ ) et J5 ( $r^2 = 0,4$ ).

Il n'y a pas de différence significative entre la version 5.1 et Turbo à J0 et J3. Néanmoins, une différence apparaît à J5 ( $p = 0,040$ ) ; la LDH est en quantité supérieure dans les CPA issus de Turbo. Mais cette différence est peut-être un artefact dû à la concentration plaquettaire (supérieure dans les CPA Turbo). En effet, si l'on compare l'évolution du rapport LDH/concentration plaquettaire à J0, J3 et J5 (tableau XXVIb), on s'aperçoit que les deux versions ne sont pas statistiquement différentes ( $p > 0,4$ ).

Les **Figures 36, 37 et 38** représentent de manière graphique l'ensemble des valeurs moyennes obtenues pour les deux types de CPA au cours de la conservation.

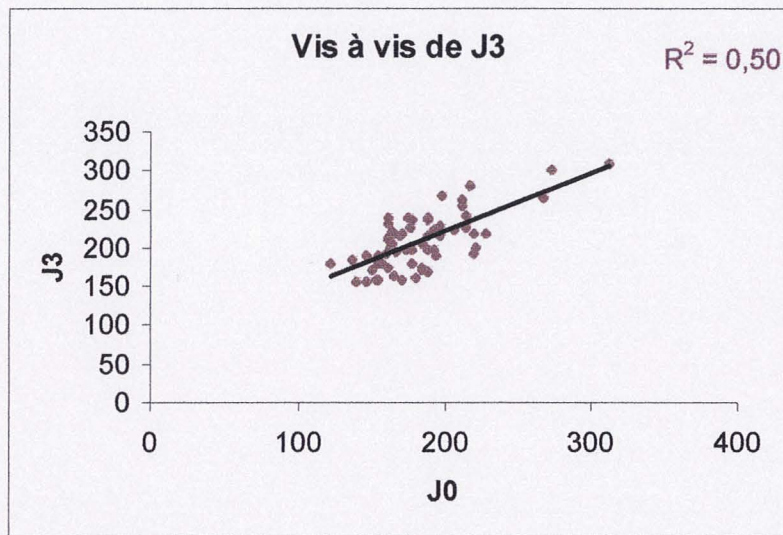
Au cours des 5 jours de conservation, deux processus ont donc été observés dans les CPA :

- une activation plaquettaire à l'origine de la dégranulation alpha et du flip-flop membranaire,
- une acidose progressive du milieu avec consommation de glucose.

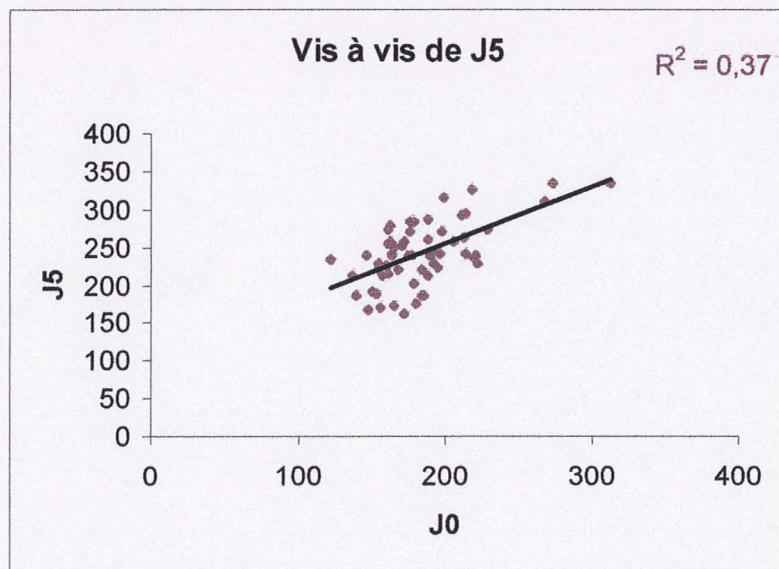
Quant à l'aspect morphologique, peu de modifications sont apparentes ; la taille des plaquettes reste stable, la lyse plaquettaire est faible, l'indice de tournoiement est évalué comme "très bon".



**Figure 35**  
**Informativité du dosage de la LDH à J0**  
**par rapport aux résultats obtenus à J3 et J5 (UI/l)**



$p < 0,0001$



$p < 0,0001$



**Figure 36**  
**Représentation graphique des moyennes de 5 paramètres :**  
**VPM, concentration plaquettaire, pH, glucose et LDH**  
**obtenues pour les deux versions aux trois temps de l'étude**

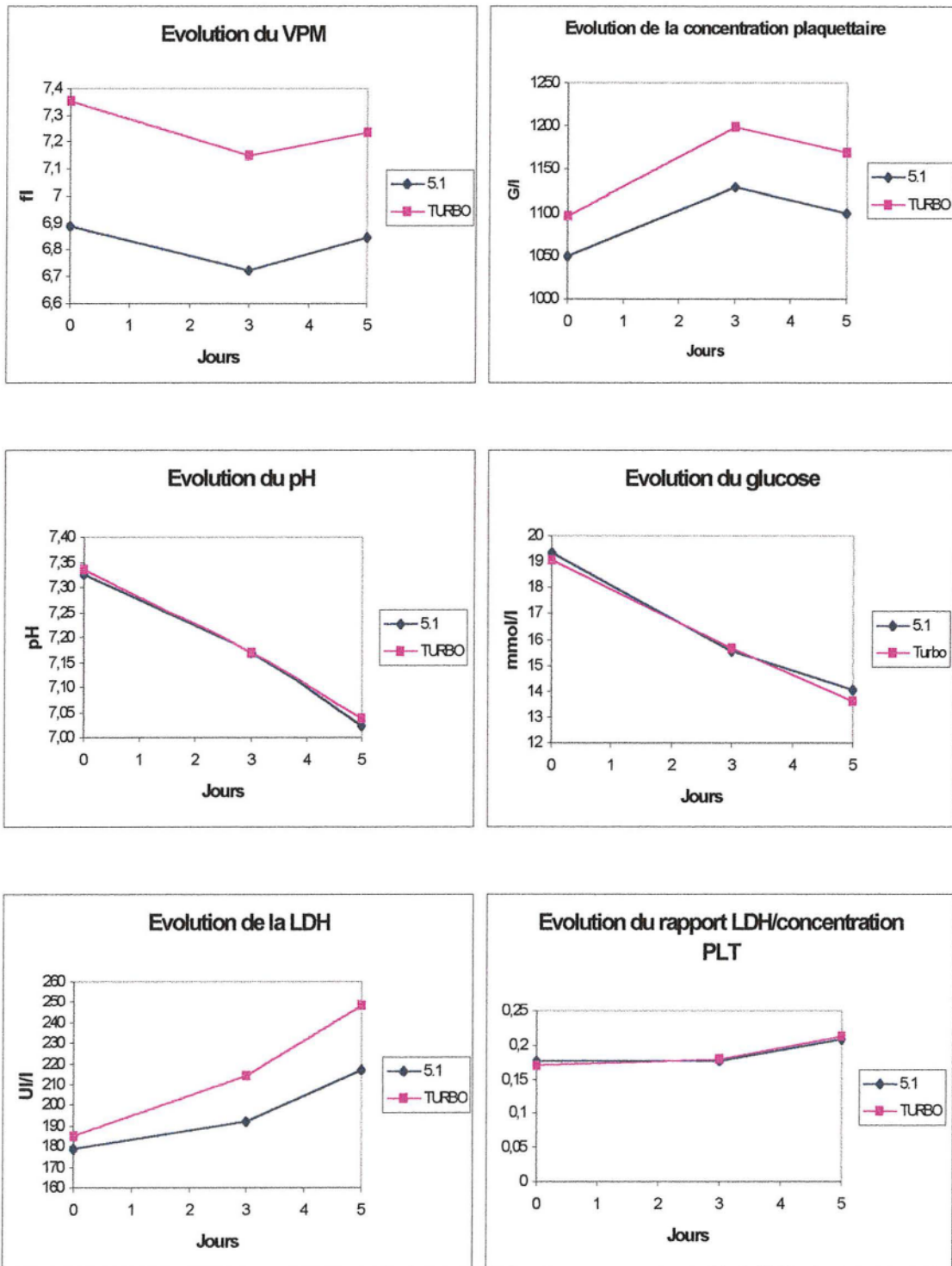
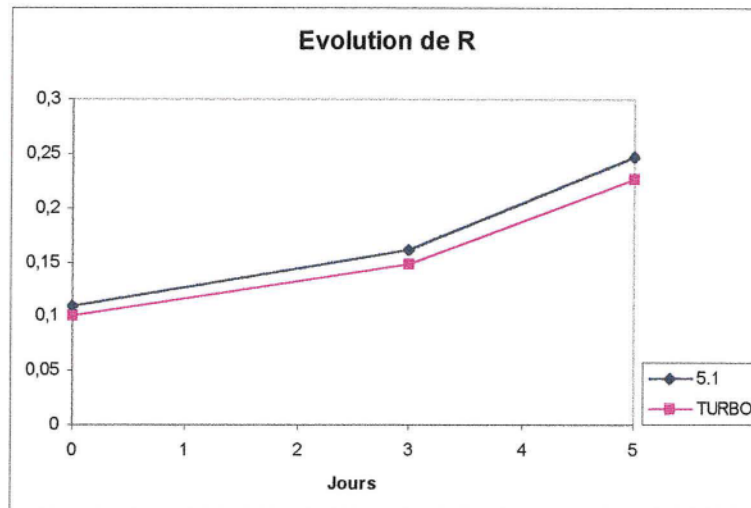
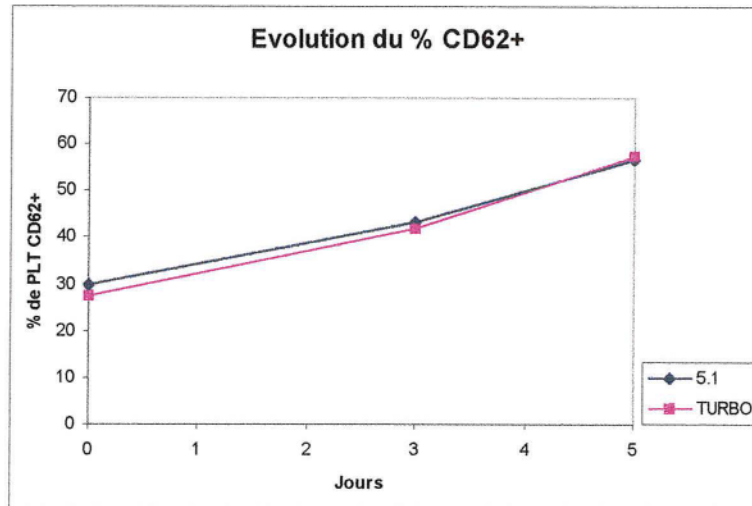
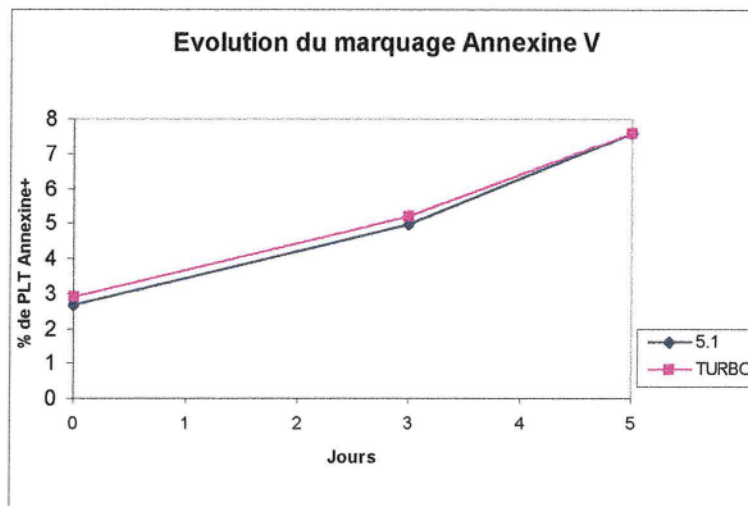


Figure 37

Représentation graphique des moyennes obtenues pour les deux versions, aux trois temps de l'étude

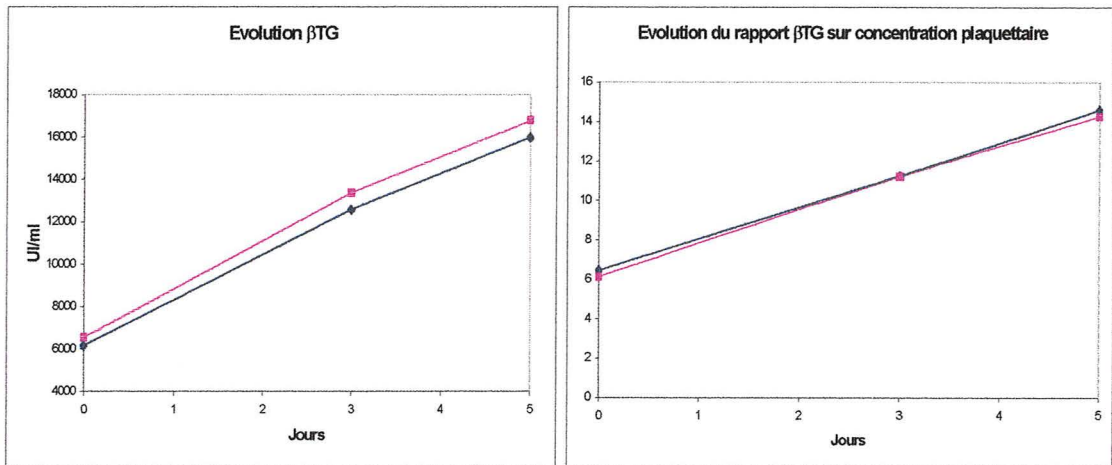


R = rapport des fluorescences (échantillon/bille 1400)

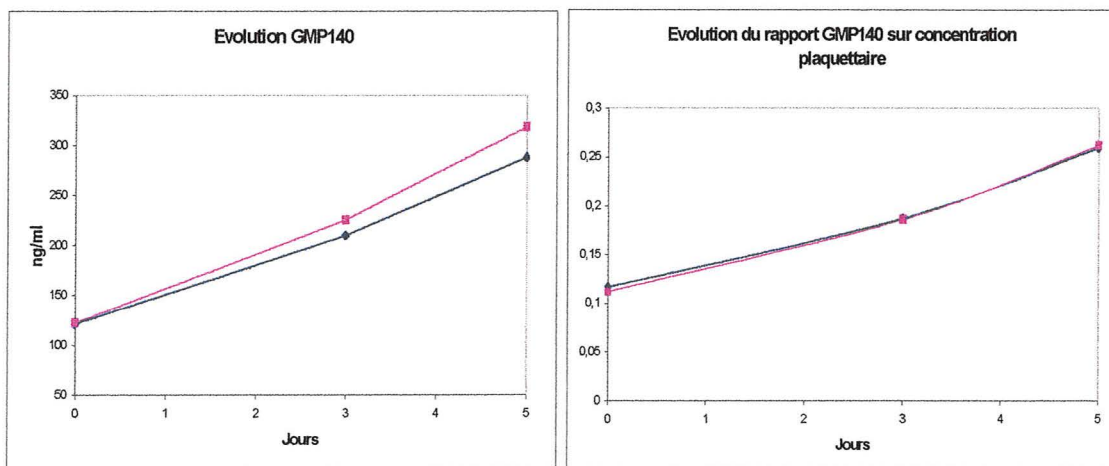


**Figure 38**  
**Représentation graphique des moyennes**  
**des dosages de facteurs solubles**  
**obtenues pour les deux versions aux trois temps de l'étude**

**βTG**



**GMP140**



— 5.1  
 — TURBO



**Tableau VII**  
**Liste complète des donneurs**  
**PROTOCOLE TURBO**

Date	n° du don	Version	Code donneur	Sexe	Remarques
21.01.99	33980555571	TURBO			
18.03.99	3398056470-	5.1	82022630	F	
8.04.99	33980564806	5.1			
4.02.99	3398055566-	TURBO	82065185	M	
10.12.98	33980555424	TURBO			
18.02.99	33980564515	5.1	82070345	F	
3.12.98	33980555395	TURBO			
11.03.99	3398056462-	5.1	82071973	M	
10.12.98	33980555432	TURBO	82072774	F	Supprimé car < 2.10 <sup>11</sup> plaquettes
7.01.99	33980555520	5.1			
18.03.99	33980564689	TURBO	82122040	M	
11.02.99	33980555694	5.1			
15.04.99	33980564814	TURBO	82180617	F	
22.04.99	33980564849	TURBO			
21.01.99	3398055558-	5.1	82223780	F	
4.03.99	33980564574	5.1			
29.04.99	33980564873	TURBO	82226081	F	
4.03.99	33980564582	TURBO			
29.04.99	33980564865	5.1	82275622	M	Supprimé car lipémique
21.01.99	33980555598	TURBO			
18.03.99	33980564662	5.1	82278181	F	
4.02.99	33980555651	5.1			
8.04.99	33980564785	TURBO	82378934	M	
17.12.98	33980555475	5.1			
11.02.99	33980555723	TURBO	82420394	M	
3.12.98	33980555387	5.1			
4.03.99	33980564590	TURBO	82422632	M	
17.12.98	33980555483	5.1			
11.02.99	33980555715	TURBO	82426664	M	
11.03.99	33980564646	5.1	82471572	F	Non convoqué pour le 2e don
10.12.98	33980555408	5.1	82655387	M	EXCLU car chirurgie
18.02.99	33980564531	TURBO			
22.04.99	33980564830	5.1	82673839	M	
11.02.99	33980555707	5.1	82777768	M	Supprimé car < 2.10 <sup>11</sup> plaquettes
21.01.99	33980555600	5.1			
25.03.99	33980564742	TURBO	82822956	F	
14.01.99	33980555539	TURBO			
25.03.99	33980564726	5.1	82855231	F	
3.12.98	33980555416	5.1			
4.02.99	33980555686	5.1	82902957	M	Supprimé car 2 prélèvements sur la même version !
18.02.99	33980564523	TURBO			
22.04.99	33980564822	5.1	82923873	F	
28.01.99	33980555619	TURBO			
8.04.99	33980564777	5.1	82924330	M	
17.12.98	33980555459	TURBO	83437535	M	Non convoqué pour le 2e don
18.02.99	3398056454-	5.1	83447613	F	EXCLU car déficit en protéine C
7.01.99	33980555491	5.1			
11.03.99	33980564638	TURBO	83482409	M	
4.02.99	33980555678	TURBO			
8.04.99	33980564769	5.1	83505581	M	
28.01.99	33980555627	5.1			
8.04.99	33980564793	TURBO	83537365	F	
7.01.99	33980555512	TURBO			
4.03.99	33980564603	5.1	83967243	M	
10.12.98	33980555440	5.1			
25.03.99	33980564750	TURBO	84201732	M	
14.01.99	33980555555	5.1			
18.03.99	33980564697	TURBO	84501854	F	
17.12.98	33980555467	TURBO			
25.02.99	33980564566	5.1	85122880	F	
25.02.99	33980564558	TURBO			
22.04.99	33980564857	5.1	85521327	F	
11.03.99	33980564611	TURBO	85708983	F	Non convoqué pour le 2e don
14.01.99	33980555547	TURBO			
18.03.99	33980564718	5.1	87118330	M	
14.01.99	33980555563	5.1			
11.03.99	33980564654	TURBO	87211984	M	
28.01.99	33980555635	TURBO			
25.03.99	33980564734	5.1	87713164	M	
28.01.99	33980555643	5.1	89827963	F	EXCLU car chirurgie
7.01.99	33980555504	TURBO			
18.03.99	33980564670	5.1	91401456	M	

**TABEAU VIII**  
**PARAMETRES HEMATOLOGIQUES DES DONNEURS AVANT ET APRES LA CYTAPHERESE**

VERSION 5.1										Code donneur	VERSION TURBO									
AVANT					APRES						AVANT					APRES				
GB 10e3/µl	GR 10e6/µl	Hématocrite	Hémoglobine (g/l)	plaquettes 10e3/µl	GB 10e3/µl	GR 10e6/µl	Hématocrite	Hémoglobine (g/l)	plaquettes 10e3/µl		GB 10e3/µl	GR 10e6/µl	Hématocrite	Hémoglobine (g/l)	plaquettes 10e3/µl	GB 10e3/µl	GR 10e6/µl	Hématocrite	Hémoglobine (g/l)	plaquettes 10e3/µl
5,6	4,23	39%	12,7	271	5,2	3,91	37%	12,2	186	82022630	5,4	4,01	36%	12,1	257	5,2	3,79	35%	11,8	186
7,7	5,31	46%	15,2	219	6,5	4,83	42%	14,3	154	82065185	6,4	5,11	44%	14,7	194	6,0	4,60	40%	13,8	131
7,4	4,61	41%	13,3	236	6,7	4,19	37%	12,7	151	82070345	8,2	4,48	41%	14,0	246	7,5	4,21	38%	13,2	155
7,9	4,48	39%	13,0	252	7,0	4,22	37%	12,6	174	82071973	10,8	4,79	43%	14,4	295	10,1	4,40	39%	13,4	196
8,2	6,10	49%	16,0	141	7,8	5,58	45%	15,2	107	82122040	9,0	5,97	49%	16,2	153	7,4	5,50	46%	15,6	121
8,5	4,60	41%	14,1	328	8,1	4,24	39%	13,2	192	82180617	8,0	4,52	40%	13,5	353	7,9	3,84	34%	11,9	211
5,4	4,06	36%	12,0	272	6,7	3,96	35%	11,8	205	82223780	6,0	4,22	38%	12,2	258	6,1	3,87	35%	11,6	179
8,9	3,84	36%	12,1	290	7,9	3,58	35%	11,6	198	82226081	6,9	3,72	35%	11,5	277	6,1	3,43	33%	11,1	175
7,2	3,93	38%	12,5	227	6,6	3,58	35%	11,4	155	82278181	8,2	4,13	39%	13,2	208	8,5	3,88	37%	12,6	155
5,0	4,40	41%	13,8	178	4,1	4,03	38%	12,8	125	82378934	6,4	4,50	41%	13,4	251	4,9	4,01	37%	12,3	169
5,2	4,66	43%	14,7	214	5,3	4,33	39%	13,8	146	82420394	6,8	4,61	42%	13,9	240	6,0	4,12	37%	12,9	173
5,9	4,90	47%	16,0	213	6,2	4,52	44%	15,4	156	82422632	5,6	4,68	44%	14,7	196	5,7	4,42	42%	14,6	147
8,5	4,91	44%	15,1	192	8,6	4,72	42%	14,4	121	82426664	8,1	5,13	45%	15,1	207	7,2	4,70	42%	14,1	138
6,1	5,32	44%	14,2	194	6,3	5,10	42%	13,9	154	82673839	6,8	5,32	44%	14,5	229	7,0	4,76	40%	13,5	160
5,3	4,29	37%	12,6	226	5,5	4,23	37%	12,6	151	82822956	6,4	4,64	41%	13,2	230	5,7	4,25	37%	12,6	137
7,7	4,21	38%	12,5	216	7,3	3,90	36%	11,6	140	82855231	7,2	3,86	35%	11,8	231	7,9	3,70	34%	11,7	163
6,6	4,37	40%	12,9	211	5,2	3,91	35%	11,5	140	82923873	5,4	4,41	40%	13,3	285	5,2	4,08	37%	12,5	181
8,7	4,88	43%	13,7	245	8,1	4,56	41%	13,6	180	82924330	10,4	4,83	42%	14,0	233	8,6	4,39	38%	13,1	146
7,3	4,82	45%	15,4	196	6,9	4,54	44%	14,7	139	83482409	7,4	4,77	45%	15,0	159	7,6	4,79	46%	15,5	112
6,0	4,96	44%	14,3	205	7,5	4,45	40%	12,9	163	83505581	7,3	4,79	42%	14,3	229	6,9	4,30	38%	13,2	165
5,5	3,80	35%	11,9	274	5,6	3,60	34%	11,5	167	83537365	6,6	3,94	36%	12,0	293	7,0	3,62	34%	11,0	172
6,2	4,94	44%	14,2	235	5,7	4,65	41%	14,2	182	83967243	6,7	4,99	44%	14,6	231	5,9	4,56	40%	13,6	175
5,9	4,54	40%	13,8	274	5,3	4,01	35%	12,4	192	84201732	6,4	4,44	40%	13,1	264	5,1	4,11	36%	12,5	170
6,2	4,11	39%	13,2	214	6,3	3,69	35%	12,1	136	84511854	6,0	3,97	38%	12,6	201	5,3	3,73	36%	11,9	134
8,1	4,29	38%	12,5	191	8,6	3,75	39%	12,0	116	85122880	8,1	4,11	37%	13,1	208	8,6	3,80	34%	12,1	120
7,7	4,22	38%	12,7	212	8,3	3,86	35%	11,9	127	85521327	9,4	4,29	38%	12,6	201	9,4	4,05	34%	12,3	95
5,9	4,73	42%	14,3	247	5,5	4,41	40%	13,8	171	87118330	6,5	4,65	42%	14,1	242	5,7	4,25	38%	13,6	169
5,6	4,60	40%	13,4	225	5,6	4,15	36%	12,3	166	87211984	6,3	4,53	39%	13,1	191	6,1	4,31	37%	12,5	158
9,0	4,63	42%	14,1	256	8,7	4,42	40%	13,8	183	87713164	12,2	4,27	39%	13,3	968	10,0	4,15	38%	13,2	181
6,1	4,96	42%	14,0	220	5,5	4,65	39%	13,4	167	91401456	5,6	4,94	42%	14,2	223	5,1	4,74	40%	13,7	161
6,8	4,59	41%	13,7	229	6,6	4,25	38%	13,0	158	Moyenne	7,4	4,55	41%	13,6	258	6,9	4,21	38%	12,9	158
1,3	0,49	3%	1,1	38	1,2	0,47	3%	1,2	25	Ecart-type	1,7	0,48	3%	1,1	140	1,5	0,44	3%	1,1	26



**Tableau VIII bis**  
**Taux plaquettaires des donneurs en G/I avant et après la cytophèrese**

VERSION 5.1				VERSION TURBO		
Pré	Post	EVOLUTION	Code donneur	Pré	Post	EVOLUTION
271	186	-31%	82022630	257	186	-28%
219	154	-30%	82065185	194	131	-32%
236	151	-36%	82070345	246	155	-37%
252	174	-31%	82071973	295	196	-34%
141	107	-24%	82122040	153	121	-21%
328	192	-41%	82180617	353	211	-40%
272	205	-25%	82223780	258	179	-31%
290	198	-32%	82226081	277	175	-37%
227	155	-32%	82278181	208	155	-25%
178	125	-30%	82378934	251	169	-33%
214	146	-32%	82420394	240	173	-28%
213	156	-27%	82422632	196	147	-25%
192	121	-37%	82426664	207	138	-33%
194	154	-21%	82673839	229	160	-30%
226	151	-33%	82822956	230	137	-40%
216	140	-35%	82855231	231	163	-29%
211	140	-34%	82923873	285	181	-36%
245	180	-27%	82924330	233	146	-37%
196	139	-29%	83482409	159	112	-30%
205	163	-20%	83505581	229	165	-28%
274	167	-39%	83537365	293	172	-41%
235	182	-23%	83967243	231	175	-24%
274	192	-30%	84201732	264	170	-36%
214	136	-36%	84511854	201	134	-33%
191	116	-39%	85122880	208	120	-42%
212	127	-40%	85521327	201	95	-53%
247	171	-31%	87118330	242	169	-30%
225	166	-26%	87211984	191	158	-17%
266	183	-31%	87713164	968	181	-81%
220	167	-24%	91401456	223	161	-28%
229	158	-31%	Moyenne	258	158	-34%
37	25	6%	Ecart-type	138	25	11%

**STUDENT**  
**0,10**

TABLEAU IX  
PERFORMANCES DU SEPARATEUR

VERSION 5.1							VERSION TURBO							
Nbre plaquettes collectées (10 <sup>11</sup> )	vol de sang traité (ml)	volume d'ACD-A (ml)	précompte plaquettaire (10 <sup>3</sup> /μl)	Efficacité de collecte	temps de collecte (min)	ratio plaquettes prélevées/temps (10 <sup>11</sup> /min)	Code donneur	Nbre plaquettes collectées (10 <sup>11</sup> )	vol de sang traité (ml)	volume d'ACD-A (ml)	précompte plaquettaire (10 <sup>3</sup> /μl)	Efficacité de collecte	temps de collecte (min)	ratio plaquettes prélevées/temps (10 <sup>11</sup> /min)
3,3	3059	296	271	44%	70	0,047	82022630	3,5	3345	323	257	45%	75	0,047
2,6	3922	380	219	34%	73	0,036	82065185	2,9	3887	376	194	43%	88	0,033
3,0	3372	327	236	42%	75	0,040	82070345	3,5	3333	322	246	47%	74	0,047
3,3	3485	338	252	42%	72	0,046	82071973	4,6	3801	367	295	45%	81	0,057
2,1	5788	561	141	28%	100	0,021	82122040	2,5	5233	506	153	35%	80	0,031
2,7	2451	237	328	37%	66	0,041	82180617	3,1	2373	229	353	41%	66	0,048
3,0	2914	282	272	42%	68	0,044	82223780	2,8	3069	297	258	39%	76	0,037
3,5	2765	268	290	48%	67	0,052	82226081	3,6	3110	301	277	46%	75	0,048
3,0	3574	346	227	41%	85	0,035	82276181	3,2	3798	367	208	45%	110	0,029
2,8	4521	438	178	39%	85	0,033	82378934	3,3	3348	323	251	44%	60	0,055
3,4	4474	433	214	39%	80	0,043	82420394	3,0	3272	316	240	43%	70	0,043
3,1	4215	408	213	38%	92	0,034	82422632	3,4	3876	375	196	50%	65	0,053
3,5	4659	451	192	43%	90	0,039	82426664	2,9	3746	362	207	41%	70	0,041
2,9	4267	413	194	39%	83	0,035	82673839	2,9	3552	343	229	40%	65	0,045
3,3	3793	367	226	43%	93	0,035	82822956	3,3	3598	348	230	45%	86	0,039
3,0	3767	365	216	41%	85	0,035	82855231	3,4	3579	346	231	46%	75	0,046
2,9	3986	386	211	38%	95	0,031	82923873	3,1	2888	279	285	41%	85	0,036
3,0	3461	335	245	39%	65	0,046	82924330	2,4	3266	316	233	35%	58	0,041
2,8	4091	396	196	39%	76	0,037	83482409	3,6	4741	458	159	53%	80	0,045
3,2	4184	405	205	41%	76	0,042	83505581	2,7	3431	332	229	38%	60	0,045
2,7	2765	268	274	39%	81	0,033	83537365	3,2	3159	305	293	39%	80	0,040
3,5	3519	341	235	47%	65	0,054	83967243	3,2	3379	326	231	45%	54	0,059
2,8	3081	298	274	37%	63	0,044	84201732	2,9	3121	302	264	40%	60	0,049
3,1	3729	361	214	43%	90	0,034	84501854	2,6	3820	369	201	37%	110	0,023
3,0	3714	360	191	47%	110	0,027	85122880	3,6	4048	391	208	47%	100	0,036
2,8	3745	363	212	39%	90	0,031	85521327	2,8	3855	372	201	40%	95	0,030
3,1	3571	346	247	39%	65	0,048	87118330	3,0	3262	315	242	42%	55	0,055
2,2	3129	303	225	35%	63	0,035	87211984	2,4	3413	330	191	40%	55	0,043
2,9	2976	288	266	41%	60	0,048	87713164	3,4	3053	295	268	46%	65	0,053
2,8	3718	360	220	38%	69	0,041	91401456	3,3	3507	339	223	47%	61	0,054
3,0	3690	357	229	40%	78	0,0389	Moyenne	3,14	3529	341	235	43%	74	0,0436
0,3	683	66	38	4%	13	0,0074	écart-type	0,45	535	52	42	4%	15	0,0090

Test de Student						
Nbre plaquettes collectées (10 <sup>11</sup> )	vol de sang traité	volume d'ACD-A	précompte plaquettaire	Efficacité de collecte	temps de collecte	ratio plaquettes prélevées/temps
0,047	0,084	0,070	0,262	0,003	0,101	0,002

**Tableau X**  
**Caractéristiques des CPA obtenus**

VERSION 5.1				Code donneur	VERSION TURBO			
Nombre de plaquettes collectées (10 <sup>11</sup> )	Poids CPA (g)	vol (ml) calculé	agrégats visibles		Nombre de plaquettes collectées (10 <sup>11</sup> )	Poids CPA (g)	vol (ml) calculé	agrégats visibles
3,3	290	257	1	82022630	3,5	265	255	1
3,0	263	255	1	82065185	2,9	245	236	1
2,6	265	253	1	82070345	3,5	330	317	1
2,8	310	279	1	82071973	4,6	420	404	1
2,7	260	250	1	82122040	2,5	267	257	1
2,8	260	274	1	82180617	3,1	237	228	1
3,0	262	245	1	82223780	2,8	248	238	1
3,3	260	250	3	82226081	3,6	265	255	3
2,8	245	252	2	82278181	3,2	260	250	1
2,9	265	236	3	82378934	3,3	267	257	1
3,1	256	298	1	82420394	3,0	260	250	nd
2,9	276	308	1	82422632	3,4	274	263	1
3,1	320	313	1	82426664	2,9	250	246	1
3,1	255	255	1	82673839	2,9	258	248	1
2,1	260	250	1	82822956	3,3	263	253	3
2,8	255	251	1	82855231	3,4	270	260	1
3,4	310	250	1	82923873	3,1	247	238	1
3,5	260	246	1	82924330	2,4	250	240	1
2,8	244	250	3	83482409	3,6	267	257	1
3,0	256	275	1	83505581	2,7	260	250	1
2,9	260	250	1	83537365	3,2	257	247	1
3,5	261	251	1	83967243	3,2	285	274	1
3,0	261	298	1	84201732	2,9	257	247	1
3,3	267	245	1	84501854	2,6	285	274	1
3,0	263	263	3	85122880	3,6	325	313	1
3,5	325	235	1	85521327	2,8	267	257	3
2,2	245	246	1	87118330	3,0	250	240	1
3,2	286	236	1	87211984	2,4	257	247	1
3,0	273	265	3	87713164	3,4	306	294	1
3,0	255	245	1	91401456	3,3	270	260	1
3,0	269	259		moyenne	3,1	272	262	
0,3	21	21		écart-type	0,5	35	34	

- 1 : absence  
2 : agrégats réversibles  
3 : agrégats irréversibles



**Tableau XI**  
**Mesure des leucocytes résiduels par cellule de Nageotte et CMF**

Version 5.1				Code donneur	Version TURBO			
Nageotte		CMF			Nageotte		CMF	
GB / $\mu$ l	GB/poche ( $\times 10^6$ )	GB / $\mu$ l	GB/poche ( $\times 10^6$ )	GB / $\mu$ l	GB/poche ( $\times 10^6$ )	GB / $\mu$ l	GB/poche ( $\times 10^6$ )	
0		< 0,2		82022630	0,84	0,21	0,58	0,15
0		< 0,2		82065185	0		< 0,2	
0		< 0,2		82070345	0		< 0,2	
0		< 0,2		82071973	0		< 0,2	
0		< 0,2		82122040	0,2	0,05	0,36	0,09
0		< 0,2		82180617	0		< 0,2	
0		< 0,2		82223780	0		< 0,2	
0,20	0,05	< 0,2		82226081	0		< 0,2	
0		< 0,2		82278181	0,2	0,05	0,34	0,09
0,20	0,05	< 0,2		82378934	0		< 0,2	
0		< 0,2		82420394	0,2	0,05	1,40	0,35
0		< 0,2		82422632	0		< 0,2	
0,40	0,13	< 0,2		82426664	0		0,53	0,13
0		0,46	0,12	82673839	0		0,40	0,10
0		< 0,2		82822956	0,2	0,05	< 0,2	
0		< 0,2		82855231	0		< 0,2	
0		< 0,2		82923873	0		< 0,2	
0		< 0,2		82924330	0		0,70	0,17
0		0,24	0,06	83482409	0		1,34	0,34
0		< 0,2		83505581	0		< 0,2	
0		< 0,2		83537365	0		< 0,2	
0		< 0,2		83967243	0		0,22	0,06
0,20	0,06	< 0,2		84201732	0		< 0,2	
0		< 0,2		84501854	0		< 0,2	
0,58	0,15	0,54	0,14	85122880	0,6	0,19	< 0,2	
0		< 0,2		85521327	0		< 0,2	
0		< 0,2		87118330	0		< 0,2	
0		< 0,2		87211984	0		< 0,2	
0		< 0,2		87713164	0,96	0,24	< 0,2	
0		< 0,2		91401456	0		< 0,2	

**Tableau XIV**  
**% de plaquettes CD62<sup>+</sup>**

VERSION 5.1			Code donneur	VERSION TURBO		
J0	J3	J5		J0	J3	J5
18	41	46	82022630	34	49	67
38	61	67	82065185	34	46	60
36	38	58	82070345	17	31	53
18	48	75	82071973	10	15	30
44	61	76	82122040	29	57	63
47	64	81	82180617	37	56	77
33	42	47	82223780	20	44	70
27	39	59	82226081	29	45	53
34	52	51	82278181	40	56	50
35	49	53	82378934	35	48	57
24	35	67	82420394	25	43	59
49	42	70	82422632	34	41	52
31	31	52	82426664	33	43	55
38	51	71	82673839	39	52	61
36	46	34	82822956	23	36	50
25	41	47	82855231	33	38	55
24	47	66	82923873	22	38	65
32	51	60	82924330	26	51	47
9	13	47	83482409	18	33	65
39	44	49	83505581	33	49	60
20	27	40	83537365	19	30	45
28	43	51	83967243	33	45	55
31	50	68	84201732	24	32	35
45	57	62	84501854	29	44	54
32	53	65	85122880	39	45	67
31	51	73	85521327	34	60	74
20	32	36	87118330	17	29	62
44	60	61	87211984	20	45	71
24	45	53	87713164	25	37	37
20	39	50	91401456	6	13	45
31	45	58	Moyenne	27	42	56
10	11	12	Ecart-type	9	11	11

STUDENT		
J0	J3	J5
0,03	0,11	0,63

**Tableau XV**  
**Moyennes géométriques de fluorescence totale (CD62P)**

VERSION 5.1				VERSION TURBO		
J0	J3	J5	Code donneur	J0	J3	J5
2,40	5,02	5,59	82022630	4,42	7,61	11,24
5,36	9,97	11,57	82065185	5,50	7,18	11,56
4,67	5,46	8,23	82070345	3,46	5,04	8,82
2,65	5,55	12,61	82071973	2,78	3,57	4,69
6,52	10,35	24,24	82122040	3,53	9,36	11,09
7,10	13,43	20,25	82180617	4,87	9,11	17,44
4,79	5,86	8,44	82223780	2,93	5,53	11,25
3,63	5,03	8,37	82226081	3,77	5,64	5,63
4,12	7,36	6,76	82278181	6,01	9,41	9,88
5,75	6,89	7,49	82378934	4,80	6,85	8,23
3,41	5,00	10,89	82420394	3,83	6,55	8,04
9,99	8,76	13,54	82422632	4,42	5,22	6,93
4,19	4,29	7,04	82426664	4,85	7,84	9,46
5,31	6,80	11,58	82673839	6,02	8,22	10,68
5,04	6,60	6,80	82822956	3,34	4,59	6,23
3,49	5,24	5,85	82855231	4,72	5,81	8,17
3,37	6,05	9,65	82923873	3,42	5,39	8,98
4,44	7,15	8,63	82924330	4,27	5,62	6,51
3,05	4,23	8,97	83482409	2,51	3,89	6,46
5,46	6,14	6,36	83505581	4,92	7,75	8,98
3,27	3,68	5,64	83537365	2,91	4,11	5,87
3,86	6,05	7,06	83967243	4,93	6,96	12,76
4,23	7,57	11,63	84201732	3,56	4,38	4,60
6,79	10,24	15,91	84501854	3,26	5,31	7,39
4,61	7,13	9,76	85122880	5,09	6,37	11,08
4,22	6,97	12,36	85521327	4,53	8,90	12,65
2,53	3,74	4,06	87118330	3,98	5,83	9,79
6,91	11,07	15,00	87211984	2,57	5,56	11,18
3,40	6,00	7,07	87713164	3,58	4,35	4,89
2,63	4,85	6,37	91401456	2,58	3,44	6,09
4,57	6,75	9,92	Moyenne	4,05	6,18	8,89
1,65	2,28	4,41	Ecart type	0,98	1,72	2,87
			<b>STUDENT</b>			
<b>J0</b>	<b>J3</b>	<b>J5</b>				
<b>0,115</b>	<b>0,183</b>	<b>0,206</b>				



**Tableau XVI**  
**Rapport moyennes géométriques de fluorescence :**  
**totale/bille 1400 sites**

VERSION 5.1				VERSION TURBO		
R J0	R J3	R J5	Code donneur	R J0	R J3	R J5
5,0	10,7	11,8	82022630	11,1	18,3	29,4
14,3	24,4	31,2	82065185	13,3	17,7	29,8
11,9	13,6	21,2	82070345	8,5	11,7	20,3
5,8	11,4	24,4	82071973	6,5	8,2	11,7
15,3	24,5	59,3	82122040	7,4	19,9	23,4
17,3	32,6	51,7	82180617	12,1	21,9	35,2
12,0	14,1	22,1	82223780	7,5	14,8	31,8
10,4	13,2	22,4	82226081	9,9	14,4	20,0
8,6	15,7	14,3	82278181	15,0	22,6	25,9
13,9	17,0	19,3	82378934	12,8	16,8	22,2
8,3	13,0	30,0	82420394	9,3	15,9	20,5
23,5	20,0	33,7	82422632	12,7	13,7	18,5
10,2	11,2	19,4	82426664	11,8	19,0	24,1
13,6	18,2	32,7	82673839	15,4	20,5	27,6
12,6	15,9	17,8	82822956	8,5	11,4	15,9
8,9	13,0	14,9	82855231	11,6	15,7	19,7
8,6	16,2	27,3	82923873	8,7	13,4	23,2
11,8	17,5	23,3	82924330	10,3	10,5	16,3
7,2	10,0	21,9	83482409	5,5	8,0	12,5
14,6	15,0	17,2	83505581	11,9	19,1	23,1
7,9	6,9	14,2	83537365	7,8	10,1	15,8
11,1	15,8	18,9	83967243	11,6	16,5	31,2
10,3	17,6	26,8	84201732	9,1	10,9	11,8
16,7	27,7	38,4	84501854	6,8	11,3	15,6
11,6	18,4	26,5	85122880	12,4	16,6	30,5
10,8	18,7	34,9	85521327	11,4	22,9	34,3
5,3	8,0	8,6	87118330	9,8	15,7	23,6
17,0	29,9	36,2	87211984	5,7	11,4	21,7
8,7	14,9	18,1	87713164	8,7	8,2	12,3
5,5	10,3	13,4	91401456	6,1	8,1	14,9
11,3	16,5	25,1	Moyenne	10,0	14,8	22,1
4,1	6,1	11,1	Ecart-type	2,6	4,4	6,8

STUDENT		
J0	J3	J5
0,11	0,17	0,18

**Tableau XVII**  
**% de plaquettes Annexine-V<sup>+</sup>**

<b>Version</b>	<b>Code donneur</b>	<b>J0</b>	<b>J3</b>	<b>J5</b>
5.1	82378934	3	4	8
5.1	82902957	3	4	8
5.1	82180617	2	4	7
5.1	82777768	3	12	14
5.1	85122880	4	4	6
5.1	82226081	2	2	4
5.1	83967243	2	3	6
5.1	82855231	6	4	6
5.1	87713164	2	4	7
5.1	82923873	2	4	6
5.1	82673839	2	5	8
5.1	85521327	2	3	5
5.1	82275622	3	11	17
5.1	83447613	1	3	4
TURBO	83505581	3	6	9
TURBO	82426664	3	5	8
TURBO	82420394	2	4	8
TURBO	82923873	2	5	4
TURBO	82673839	3	8	6
TURBO	85521327	6	5	10
TURBO	82275622	3	6	10
TURBO	82422632	2	4	7
TURBO	82822956	3	4	5
TURBO	84201732	3	6	8
TURBO	82180617	3	6	9
TURBO	82223780	2	4	6
TURBO	82226081	2	3	4
TURBO	82065185	4	8	12
<b>Moyenne</b>		3	5	8
<b>STUDENT</b>		0,6	0,8	1,0

Analyse non pairée

**Tableau XVIIIa**  
**βTG en UI/ml**

VERSION 5.1			Code donneur	VERSION TURBO		
J0	J3	J5		J0	J3	J5
2100	12000	13000	82022630	8000	16000	36000
11000	15000	17500	82065185	12000	20000	20000
6200	10000	17000	82070345	3700	10000	13000
2900	10000	12000	82071973	1300	2500	2500
7500	12000	17000	82122040	4200	11000	13000
8500	18000	18000	82180617	7500	18000	18000
5000	12500	15000	82223780	4200	10000	17000
5500	11500	14500	82226081	5000	9000	11000
5000	12000	13000	82278181	8500	17000	20000
11000	19000	18000	82378934	11000	14000	18000
3200	10500	16000	82420394	5000	13500	18000
5500	9000	13000	82422632	9000	13000	18000
6000	10500	13000	82426664	9000	16000	19000
8500	14000	20000	82673839	10000	20000	20000
15000	18000	27000	82822956	8500	16000	17000
5000	14000	16000	82855231	8000	12000	15000
6200	12000	15000	82923873	7000	14000	20000
10000	12000	16000	82924330	7500	13000	21000
3200	10000	16000	83482409	4000	9500	16000
12000	15000	16000	83505581	11000	19000	20000
2200	8500	13000	83537365	5500	8000	12000
9000	16000	18000	83967243	6000	17000	16500
5500	12500	15000	84201732	6500	13000	16000
12500	17000	20000	84501854	6000	11500	13000
3600	11500	19000	85122880	3400	12000	13500
6200	13000	22000	85521327	6000	18000	19000
2900	11000	13000	87118330	8000	13500	16000
6500	15000	16000	87211984	3600	11000	16000
5000	14000	15000	87713164	6500	14500	16000
2300	7500	9000	91401456	1900	8000	10500
6500	12767	16100	Moyenne	6593	13333	16700
3320	2854	3363	Ecart type	2642	3929	5210

STUDENT		
J0	J3	J5
0,86	0,38	0,59

**Tableau XVIIIb**  
**Rapport  $\beta$ TG/concentration plaquettaire**

VERSION 5.1			Code donneur	VERSION TURBO		
J0	J3	J5		J0	J3	J5
1,74	9,23	10,09	82022630	6,12	11,56	27,19
11,36	14,82	17,43	82065185	11,81	16,50	17,12
5,76	8,45	14,60	82070345	3,70	9,06	11,78
2,54	8,53	10,34	82071973	1,12	2,22	2,17
11,43	14,49	21,25	82122040	4,30	11,32	13,43
9,62	18,22	20,00	82180617	5,90	13,08	12,61
3,93	10,21	12,46	82223780	4,17	8,53	14,51
4,48	8,33	11,40	82226081	4,53	6,41	8,06
4,11	10,20	11,17	82278181	7,51	13,36	17,12
11,41	15,99	15,46	82378934	8,28	10,80	13,27
2,70	9,08	14,71	82420394	4,37	11,14	15,63
5,75	9,30	12,95	82422632	8,46	9,94	15,41
6,10	9,38	12,75	82426664	9,15	13,56	16,90
9,04	12,24	18,18	82673839	9,26	16,84	16,67
13,79	13,60	20,96	82822956	7,62	12,16	13,00
3,94	11,67	13,51	82855231	7,33	9,04	11,68
6,62	10,27	12,67	82923873	6,18	10,80	15,87
8,28	9,77	14,65	82924330	8,60	13,16	22,06
3,04	8,96	14,13	83482409	3,01	6,75	11,59
10,68	12,93	14,39	83505581	12,50	17,72	19,38
2,51	8,02	13,27	83537365	4,08	6,12	9,29
7,38	11,56	13,55	83967243	5,66	14,60	15,00
6,71	13,35	16,59	84201732	5,72	10,91	13,65
11,57	13,62	16,61	84501854	6,28	12,29	13,60
3,20	9,98	15,52	85122880	3,00	10,42	11,88
8,33	10,91	18,64	85521327	6,17	16,42	16,38
2,40	8,62	10,22	87118330	6,60	10,75	13,51
8,33	16,38	18,87	87211984	3,67	11,41	16,46
4,61	12,64	13,69	87713164	6,71	12,50	13,99
1,94	6,56	7,76	91401456	1,54	6,25	8,36
6,44	11,24	14,59	Moyenne	6,11	11,19	14,25
3,43	2,79	3,29	Ecart type	2,64	3,44	4,38
			<b>STUDENT</b>			
<b>J0</b>	<b>J3</b>	<b>J5</b>				
<b>0,55</b>	<b>0,92</b>	<b>0,72</b>				



**Tableau XIXa**  
**GMP140 en ng/ml**

VERSION 5.1			Code donneur	VERSION TURBO		
J0	J3	J5		J0	J3	J5
68	89	131	82022630	127	244	354
115	395	440	82065185	133	282	338
134	267	211	82070345	73	136	271
81	125	175	82071973	105	119	184
172	224	259	82122040	88	166	182
173	258	357	82180617	121	478	514
148	201	275	82223780	81	139	313
112	194	411	82226081	104	186	330
78	175	223	82278181	165	323	429
163	252	263	82378934	168	239	447
46	115	182	82420394	89	200	320
131	215	274	82422632	125	173	312
102	117	183	82426664	159	313	397
71	198	327	82673839	133	267	291
225	391	441	82822956	174	420	438
121	343	530	82855231	128	191	282
94	325	477	82923873	156	213	249
105	159	299	82924330	101	156	183
115	128	146	83482409	192	112	164
189	175	324	83505581	124	360	532
117	172	217	83537365	152	163	255
97	160	213	83967243	121	172	226
106	221	337	84201732	145	443	595
123	186	247	84501854	65	50	78
85	106	149	85122880	72	167	201
69	270	369	85521327	96	238	289
104	150	233	87118330	176	262	431
105	168	297	87211984	64	132	218
231	463	449	87713164	175	243	280
44	76	87	91401456	72	161	198
117	211	284	Moyenne	123	225	310
46	94	110	Ecart type	37	100	118
<b>STUDENT</b>						
<b>J0</b>		<b>J3</b>		<b>J5</b>		
<b>0,57</b>		<b>0,50</b>		<b>0,33</b>		



**Tableau XIXb**  
**Rapport GMP 140 / Concentration plaquettaire**

VERSION 5.1				VERSION TURBO		
J0	J3	J5	Code donneur	J0	J3	J5
0,06	0,07	0,10	82022630	0,10	0,18	0,27
0,12	0,39	0,44	82065185	0,13	0,23	0,29
0,12	0,23	0,18	82070345	0,07	0,12	0,25
0,07	0,11	0,15	82071973	0,09	0,11	0,16
0,26	0,27	0,32	82122040	0,09	0,17	0,19
0,20	0,26	0,40	82180617	0,10	0,35	0,36
0,12	0,16	0,23	82223780	0,08	0,12	0,27
0,09	0,14	0,32	82226081	0,09	0,13	0,24
0,06	0,15	0,19	82278181	0,15	0,25	0,37
0,17	0,21	0,23	82378934	0,13	0,18	0,33
0,04	0,10	0,17	82420394	0,08	0,17	0,28
0,14	0,22	0,27	82422632	0,12	0,13	0,27
0,10	0,10	0,18	82426664	0,16	0,27	0,35
0,08	0,17	0,30	82673839	0,12	0,22	0,24
0,21	0,30	0,34	82822956	0,16	0,32	0,33
0,10	0,29	0,45	82855231	0,12	0,14	0,22
0,10	0,28	0,40	82923873	0,14	0,16	0,20
0,09	0,13	0,27	82924330	0,12	0,16	0,19
0,11	0,11	0,13	83482409	0,14	0,08	0,12
0,17	0,15	0,29	83505581	0,14	0,34	0,52
0,13	0,16	0,22	83537365	0,11	0,12	0,20
0,08	0,12	0,16	83967243	0,11	0,15	0,21
0,13	0,24	0,37	84201732	0,13	0,37	0,51
0,11	0,15	0,21	84501854	0,07	0,05	0,08
0,08	0,09	0,12	85122880	0,06	0,14	0,18
0,09	0,23	0,31	85521327	0,10	0,22	0,25
0,09	0,12	0,18	87118330	0,15	0,21	0,36
0,13	0,18	0,35	87211984	0,07	0,14	0,22
0,21	0,42	0,41	87713164	0,18	0,21	0,24
0,04	0,07	0,08	91401456	0,06	0,13	0,16
0,12	0,19	0,26	Moyenne	0,11	0,19	0,26
0,05	0,09	0,10	Ecart type	0,03	0,08	0,10
<b>STUDENT</b>						
J0	J3	J5				
0,64	0,95	0,92				

**Tableau XX**  
**VPM en fl**

VERSION 5.1			Code donneur	VERSION TURBO		
J0	J3	J5		J0	J3	J5
6,70	6,80	6,60	82022630	7,40	6,90	7,10
7,10	7,20	7,30	82065185	7,40	7,40	7,60
7,50	6,10	6,40	82070345	6,50	6,50	6,50
6,70	6,80	7,00	82071973	7,00	6,70	7,10
5,70	5,70	6,00	82122040	6,00	6,20	6,30
5,60	5,70	5,80	82180617	6,30	6,00	6,00
6,40	6,00	6,10	82223780	6,80	6,40	6,30
6,80	6,80	6,90	82226081	8,10	7,20	7,00
6,20	6,40	6,40	82278181	6,50	6,30	6,50
7,80	7,50	7,60	82378934	7,40	7,50	7,40
6,90	7,30	7,40	82420394	7,20	7,30	7,50
6,10	5,80	6,00	82422632	6,90	6,60	6,70
7,50	7,30	7,40	82426664	7,90	7,90	8,00
8,50	8,10	8,20	82673839	8,90	8,10	8,50
7,60	7,20	7,10	82822956	7,40	7,20	7,30
7,30	7,40	7,40	82855231	6,70	7,70	7,50
6,60	6,00	6,10	82923873	6,80	5,50	5,70
7,60	7,20	7,20	82924330	7,90	7,80	8,00
8,00	7,90	8,20	83482409	8,70	8,70	8,50
6,40	6,50	6,60	83505581	6,30	6,40	6,40
6,40	6,20	6,20	83537365	6,70	6,80	6,80
7,30	7,30	7,20	83967243	7,80	7,80	7,50
7,30	7,20	7,50	84201732	7,80	7,50	7,40
6,90	7,10	7,30	84501854	6,60	6,90	6,90
7,20	7,30	7,60	85122880	7,30	7,40	7,40
7,60	7,20	7,00	85521327	9,50	7,00	7,20
6,60	6,50	6,50	87118330	7,60	6,50	6,70
6,50	6,30	6,20	87211984	6,50	6,40	6,40
7,50	7,50	7,40	87713164	7,80	7,60	7,60
6,90	6,90	6,90	91401456	6,70	6,80	7,10
6,97	6,84	6,92	Moyenne	7,28	7,03	7,10
0,66	0,64	0,64	Ecart type	0,81	0,69	0,67

STUDENT		
J0	J3	J5
0,005	0,002	0,002

**Tableau XXI**  
**Concentrations plaquettaires en G/l**

VERSION 5.1			Code donneur	VERSION TURBO		
J0	J3	J5		J0	J3	J5
1208	1300	1288	82022630	1308	1384	1324
968	1012	1004	82065185	1016	1212	1168
1076	1184	1164	82070345	1000	1104	1104
1140	1172	1160	82071973	1164	1128	1152
656	828	800	82122040	976	972	968
884	988	900	82180617	1272	1376	1428
1272	1224	1204	82223780	1008	1172	1172
1228	1380	1272	82226081	1104	1404	1364
1216	1176	1164	82278181	1132	1272	1168
964	1188	1164	82378934	1328	1296	1356
1184	1156	1088	82420394	1144	1212	1152
956	968	1004	82422632	1064	1308	1168
984	1120	1020	82426664	984	1180	1124
940	1144	1100	82673839	1080	1188	1200
1088	1324	1288	82822956	1116	1316	1308
1268	1200	1184	82855231	1092	1328	1284
936	1168	1184	82923873	1132	1296	1260
1208	1228	1092	82924330	872	988	952
1052	1116	1132	83482409	1328	1408	1380
1124	1160	1112	83505581	880	1072	1032
876	1060	980	83537365	1348	1308	1292
1220	1384	1328	83967243	1060	1164	1100
820	936	904	84201732	1136	1192	1172
1080	1248	1204	84501854	956	936	956
1124	1152	1224	85122880	1132	1152	1136
744	1192	1180	85521327	972	1096	1160
1208	1276	1272	87118330	1212	1256	1184
780	916	848	87211984	980	964	972
1084	1108	1096	87713164	968	1160	1144
1188	1144	1160	91401456	1236	1280	1256
1049	1148	1117	Moyenne	1100	1204	1181
164	129	132	Ecart type	130	130	126

STUDENT		
J0	J3	J5
0,19	0,07	0,04

**Tableau XXII**  
**Evolution du VPM DE J0 à J3**

VERSION 5.1			Code donneur	VERSION TURBO		
J0	J3	EVOLUTION		J0	J3	EVOLUTION
6,70	6,80	1,49%	82022630	7,40	6,90	-6,76%
7,10	7,20	1,41%	82065185	7,40	7,40	0,00%
7,50	6,10	-18,67%	82070345	6,50	6,50	0,00%
6,70	6,80	1,49%	82071973	7,00	6,70	-4,29%
5,70	5,70	0,00%	82122040	6,00	6,20	3,33%
5,60	5,70	1,79%	82180617	6,30	6,00	-4,76%
6,40	6,00	-6,25%	82223780	6,80	6,40	-5,88%
6,80	6,80	0,00%	82226081	8,10	7,20	-11,11%
6,20	6,40	3,23%	82278181	6,50	6,30	-3,08%
7,80	7,50	-3,85%	82378934	7,40	7,50	1,35%
6,90	7,30	5,80%	82420394	7,20	7,30	1,39%
6,10	5,80	-4,92%	82422632	6,90	6,60	-4,35%
7,50	7,30	-2,67%	82426664	7,90	7,90	0,00%
8,50	8,10	-4,71%	82673839	8,90	8,10	-8,99%
7,60	7,20	-5,26%	82822956	7,40	7,20	-2,70%
7,30	7,40	1,37%	82855231	6,70	7,70	14,93%
6,60	6,00	-9,09%	82923873	6,80	5,50	-19,12%
7,60	7,20	-5,26%	82924330	7,90	7,80	-1,27%
8,00	7,90	-1,25%	83482409	8,70	8,70	0,00%
6,40	6,50	1,56%	83505581	6,30	6,40	1,59%
6,40	6,20	-3,13%	83537365	6,70	6,80	1,49%
7,30	7,30	0,00%	83967243	7,80	7,80	0,00%
7,30	7,20	-1,37%	84201732	7,80	7,50	-3,85%
6,90	7,10	2,90%	84501854	6,60	6,90	4,55%
7,20	7,30	1,39%	85122880	7,30	7,40	1,37%
7,60	7,20	-5,26%	85521327	9,50	7,00	-26,32%
6,60	6,50	-1,52%	87118330	7,60	6,50	-14,47%
6,50	6,30	-3,08%	87211984	6,50	6,40	-1,54%
7,50	7,50	0,00%	87713164	7,80	7,60	-2,56%
6,90	6,90	0,00%	91401456	6,70	6,80	1,49%
6,97	6,84	-1,79%	Moyenne	7,28	7,03	-2,98%
0,66	0,64	4,54%	Ecart type	0,81	0,69	7,42%
			<b>STUDENT</b> <b>0,40</b>			

**Tableau XXIII**  
**Evolution du VPM de J3 à J5**

VERSION 5.1			Code donneur	VERSION TURBO		
J3	J5	EVOLUTION		J3	J5	EVOLUTION
6,80	6,60	-2,94%	82022630	6,90	7,10	2,90%
7,20	7,30	1,39%	82065185	7,40	7,60	2,70%
6,10	6,40	4,92%	82070345	6,50	6,50	0,00%
6,80	7,00	2,94%	82071973	6,70	7,10	5,97%
5,70	6,00	5,26%	82122040	6,20	6,30	1,61%
5,70	5,80	1,75%	82180617	6,00	6,00	0,00%
6,00	6,10	1,67%	82223780	6,40	6,30	-1,56%
6,80	6,90	1,47%	82226081	7,20	7,00	-2,78%
6,40	6,40	0,00%	82278181	6,30	6,50	3,17%
7,50	7,60	1,33%	82378934	7,50	7,40	-1,33%
7,30	7,40	1,37%	82420394	7,30	7,50	2,74%
5,80	6,00	3,45%	82422632	6,60	6,70	1,52%
7,30	7,40	1,37%	82426664	7,90	8,00	1,27%
8,10	8,20	1,23%	82673839	8,10	8,50	4,94%
7,20	7,10	-1,39%	82822956	7,20	7,30	1,39%
7,40	7,40	0,00%	82855231	7,70	7,50	-2,60%
6,00	6,10	1,67%	82923873	5,50	5,70	3,64%
7,20	7,20	0,00%	82924330	7,80	8,00	2,56%
7,90	8,20	3,80%	83482409	8,70	8,50	-2,30%
6,50	6,60	1,54%	83505581	6,40	6,40	0,00%
6,20	6,20	0,00%	83537365	6,80	6,80	0,00%
7,30	7,20	-1,37%	83967243	7,80	7,50	-3,85%
7,20	7,50	4,17%	84201732	7,50	7,40	-1,33%
7,10	7,30	2,82%	84501854	6,90	6,90	0,00%
7,30	7,60	4,11%	85122880	7,40	7,40	0,00%
7,20	7,00	-2,78%	85521327	7,00	7,20	2,86%
6,50	6,50	0,00%	87118330	6,50	6,70	3,08%
6,30	6,20	-1,59%	87211984	6,40	6,40	0,00%
7,50	7,40	-1,33%	87713164	7,60	7,60	0,00%
6,90	6,90	0,00%	91401456	6,80	7,10	4,41%
6,84	6,92	1,16%	Moyenne	7,03	7,10	0,97%
0,64	0,64	2,12%	Ecart type	0,69	0,67	2,39%
			<b>STUDENT</b> <b>0,76</b>			

**Tableau XXIV**  
**pH à 37°C**

VERSION 5.1				VERSION TURBO		
J0	J3	J5	Code donneur	J0	J3	J5
7,35	7,27	7,10	82022630	7,30	7,15	7,01
7,38	7,21	7,01	82065185	7,33	7,08	6,78
7,34	7,21	7,14	82070345	7,29	7,19	7,09
7,25	7,12	6,85	82071973	7,18	7,05	7,01
7,35	7,11	6,89	82122040	7,43	7,21	6,97
7,17	6,93	6,73	82180617	7,28	7,04	6,82
7,35	7,24	7,12	82223780	7,35	7,15	7,03
7,26	7,07	6,94	82226081	7,34	7,04	6,98
7,34	7,19	7,00	82278181	7,36	7,19	7,02
7,29	7,11	6,90	82378934	7,37	7,14	7,02
7,31	7,10	6,93	82420394	7,36	7,11	6,90
7,18	7,00	6,74	82422632	7,34	7,12	6,92
7,34	7,23	7,11	82426664	7,34	7,01	6,78
7,33	7,13	7,04	82673839	7,33	7,10	7,07
7,33	7,29	7,22	82822956	7,29	7,24	7,16
7,26	7,12	7,03	82855231	7,34	7,13	7,08
7,34	7,08	6,97	82923873	7,37	7,18	7,10
7,35	7,19	7,07	82924330	7,36	7,29	7,22
7,29	7,15	7,05	83482409	7,24	7,19	7,11
7,43	7,38	7,29	83505581	7,38	7,34	7,14
7,37	7,29	7,14	83537365	7,40	7,24	7,05
7,39	7,18	7,08	83967243	7,34	7,17	7,04
7,28	7,14	7,04	84201732	7,28	7,10	6,95
7,37	7,18	6,97	84501854	7,39	7,33	7,15
7,41	7,25	7,17	85122880	7,36	7,16	7,06
7,35	7,20	7,10	85521327	7,35	7,14	7,08
7,34	7,22	7,08	87118330	7,35	7,24	7,14
7,34	7,15	7,03	87211984	7,25	7,27	7,19
7,29	7,10	6,97	87713164	7,34	7,23	7,11
7,37	7,20	6,98	91401456	7,38	7,25	7,14
7,33	7,17	7,02	Moyenne	7,33	7,17	7,04
0,06	0,09	0,12	Ecart-type	0,05	0,08	0,11

STUDENT		
J0	J3	J5
0,40	0,90	0,54

**Tableau XXV**  
**Glucose en mmol/l**

Version 5.1			Code donneur	Version TURBO		
J0	J3	J5		J0	J3	J5
19,8	7,5	9,0	82022630	18,1	14,1	10,6
12,4	12,2	10,4	82065185	7,8	14,2	6,9
18,4	7,4	6,0	82070345	18,4	17,3	16,0
20,6	9,0	5,4	82071973	20,8	17,4	15,0
20,1	19,5	11,3	82122040	19,4	7,2	8,0
11,8	7,2	7,5	82180617	14,9	10,8	9,5
19,8	6,3	12,0	82223780	14,6	13,5	10,1
16,5	7,8	6,4	82226081	12,3	8,9	9,2
19,8	8,9	10,1	82278181	16,5	12,9	11,3
7,9	7,2	6,5	82378934	13,9	12,8	9,5
18,1	13,2	14,8	82420394	11,4	8,1	5,9
22,7	19,5	18,7	82422632	18,5	6,9	6,2
17,3	17,1	14,7	82426664	11,5	9,0	7,3
13,0	11,3	9,0	82673839	19,6	17,1	6,3
19,7	16,6	13,9	82822956	18,1	10,0	7,7
11,9	9,8	9,4	82855231	17,6	19,6	15,8
13,0	10,4	7,8	82923873	8,2	14,3	12,6
11,0	11,7	9,6	82924330	19,1	14,6	12,2
19,6	17,4	14,9	83482409	17,2	5,6	6,9
12,4	13,5	10,9	83505581	8,1	15,7	5,9
16,7	14,0	13,4	83537365	9,2	10,3	8,2
11,9	6,9	8,3	83967243	20,5	19,2	14,9
22,8	14,6	17,4	84201732	13,2	9,1	8,3
18,5	15,7	8,3	84501854	18,8	7,3	13,2
11,5	8,5	5,3	85122880	17,7	15,3	13,3
12,9	9,5	11,0	85521327	13,3	8,7	5,8
20,0	6,0	8,4	87118330	19,2	16,0	15,3
22,2	14,6	16,5	87211984	21,1	8,0	7,4
14,1	8,9	8,2	87713164	17,1	13,1	11,7
19,8	7,4	14,6	91401456	19,5	15,6	13,7
16,5	11,3	10,7	Moyenne	15,9	12,4	10,2
4,1	4,0	3,6	Ecart-type	4,0	3,9	3,3

STUDENT		
J0	J3	J5
0,44	0,42	0,67



**Tableau XXVIa**  
**LDH en UI/l**

VERSION 5.1				VERSION TURBO		
J0	J3	J5	Code donneur	J0	J3	J5
139	155	185	82022630	175	238	283
197	229	271	82065185	217	280	326
178	178	201	82070345	154	178	219
177	197	238	82071973	188	239	260
180	161	174	82122040	147	156	167
155	159	170	82180617	189	216	242
196	216	240	82223780	171	217	256
137	185	213	82226081	206	223	257
153	159	187	82278181	165	219	249
312	308	334	82378934	273	301	333
146	189	238	82420394	163	199	240
185	171	186	82422632	220	219	238
188	168	212	82426664	164	205	239
176	226	271	82673839	170	215	251
178	236	283	82822956	122	180	232
161	239	274	82855231	188	236	287
162	232	279	82923873	161	173	214
267	265	310	82924330	228	218	272
165	164	173	83482409	214	242	294
221	199	229	83505581	192	198	229
189	198	239	83537365	219	192	235
212	254	263	83967243	214	225	240
167	194	221	84201732	198	266	316
184	206	219	84501854	171	157	162
184	174	186	85122880	160	191	224
164	220	255	85521327	161	211	254
157	179	213	87118330	174	197	239
150	171	192	87211984	162	213	256
154	190	227	87713164	194	189	223
192	222	245	91401456	211	262	291
181	201	231	Moyenne	186	215	251
36	36	41	Ecart type	30	33	38
<b>STUDENT</b>						
<b>J0</b>		<b>J3</b>		<b>J5</b>		
<b>0,39</b>		<b>0,07</b>		<b>0,02</b>		



**Tableau XXVIb**  
**Rapport LDH/concentration plaquettaire**

VERSION 5.1				VERSION TURBO		
J0	J3	J5	Code donneur	J0	J3	J5
0,12	0,12	0,14	82022630	0,13	0,17	0,21
0,20	0,23	0,27	82065185	0,21	0,23	0,28
0,17	0,15	0,17	82070345	0,15	0,16	0,20
0,16	0,17	0,21	82071973	0,16	0,21	0,23
0,27	0,19	0,22	82122040	0,15	0,16	0,17
0,18	0,16	0,19	82180617	0,15	0,16	0,17
0,15	0,18	0,20	82223780	0,17	0,19	0,22
0,11	0,13	0,17	82226081	0,19	0,16	0,19
0,13	0,14	0,16	82278181	0,15	0,17	0,21
0,32	0,26	0,29	82378934	0,21	0,23	0,25
0,12	0,16	0,22	82420394	0,14	0,16	0,21
0,19	0,18	0,19	82422632	0,21	0,17	0,20
0,19	0,15	0,21	82426664	0,17	0,17	0,21
0,19	0,20	0,25	82673839	0,16	0,18	0,21
0,16	0,18	0,22	82822956	0,11	0,14	0,18
0,13	0,20	0,23	82855231	0,17	0,18	0,22
0,17	0,20	0,24	82923873	0,14	0,13	0,17
0,22	0,22	0,28	82924330	0,26	0,22	0,29
0,16	0,15	0,15	83482409	0,16	0,17	0,21
0,20	0,17	0,21	83505581	0,22	0,18	0,22
0,22	0,19	0,24	83537365	0,16	0,15	0,18
0,17	0,18	0,20	83967243	0,20	0,19	0,22
0,20	0,21	0,24	84201732	0,17	0,22	0,27
0,17	0,17	0,18	84501854	0,18	0,17	0,17
0,16	0,15	0,15	85122880	0,14	0,17	0,20
0,22	0,18	0,22	85521327	0,17	0,19	0,22
0,13	0,14	0,17	87118330	0,14	0,16	0,20
0,19	0,19	0,23	87211984	0,17	0,22	0,26
0,14	0,17	0,21	87713164	0,20	0,16	0,19
0,16	0,19	0,21	91401456	0,17	0,20	0,23
0,18	0,18	0,21	Moyenne	0,17	0,18	0,21
0,04	0,03	0,04	Ecart type	0,03	0,03	0,03
<b>STUDENT</b>						
<b>J0</b>		<b>J3</b>		<b>J5</b>		
0,42		0,52		0,44		

# *Discussion*

## DISCUSSION

L'objectif de notre travail était d'évaluer la qualité des concentrés plaquettaires d'aphérèse (CPA) issus de deux séparateurs COBE Spectra différents (version 5.1 et version Turbo) par un suivi de paramètres biologiques pendant 5 jours. D'une manière générale, il a déjà été montré qu'un CPA subissait, au cours de sa conservation, une perte de qualité (ou "storage lesion"), caractérisée par une multitude de modifications concernant la plaquette elle-même ou son environnement.

Avant l'étude des premiers CPA dans le cadre du protocole d'évaluation requis par l'AFS, nous avons effectué quelques préliminaires techniques concernant la mesure de l'activation plaquettaire par cytométrie de flux (CMF).

Le principe est le suivant : des épitopes non détectables à l'état quiescent apparaissent à la surface des plaquettes après stimulation et sont analysées par CMF qui donne une indication directe sur le statut d'activation des plaquettes. Mais la littérature souligne que la population plaquettaire est difficile à étudier par cette technique car elle subit des phénomènes d'agrégation et d'activation *in vitro*. Les plaquettes étant, par nature, extrêmement réactives, elles doivent être manipulées avec précaution.

Les intérêts d'une analyse par CMF sont :

- ♦ le petit volume d'échantillon nécessaire
- ♦ la grande sensibilité pour la détection de la population plaquettaire (60). Tschoepe et Rinder en 1990 et 1993 ont souligné le fait que la CMF est plus sensible et plus directe pour la détection de l'activation plaquettaire que la mesure de la  $\beta$ TG (102) (79). La cytométrie serait également 20 à 50 fois plus sensible que l'agrégométrie (39).
- ♦ l'utilisation d'anticorps monoclonaux minimisant les liaisons non spécifiques (58)
- ♦ la rapidité de l'analyse (plusieurs milliers d'événements analysés par seconde)
- ♦ l'analyse de chaque plaquette de manière individuelle
- ♦ la quantification objective de l'intensité des paramètres mesurés. Il a été montré que la limite de détection de la liaison d'un anticorps par cytométrie est d'environ 500 anticorps/plaquette (58) et la limite de détection des plaquettes activées est de 1% dans des échantillons de plaquettes stimulées et non stimulées (82).

La CMF présente toutefois une contrainte :

Elle impose l'étude de plaquettes non agrégées car il s'agit de l'analyse de la fluorescence de chaque plaquette individuelle. Nous nous sommes efforcés de minimiser les agrégats plaquettaires par :

- un échantillonnage à partir de la poche, réalisé de manière douce en évitant les bulles d'air et les turbulences de la suspension (étape délicate)
- la baisse de la concentration plaquettaire par la dilution de l'échantillon
- l'utilisation de tubes en polypropylène pour éviter le contact de surfaces activatrices comme le verre
- l'absence de vortex
- l'agitation très douce après ajout de l'agoniste (hors protocole) et l'incubation sans agitation.

Nous avons veillé également à travailler rapidement et à manipuler les plaquettes au minimum.

Nous avons été confrontés à plusieurs problèmes méthodologiques liés à la CMF :

### ① Il faut empêcher l'activation plaquettaire *in vitro*.

En effet, nous souhaitons connaître le statut d'activation plaquettaire dans la poche à un instant donné. Notre observation qui porte sur les antigènes de surface ne doit pas perturber leur expression et nous ne devons ni altérer la surface membranaire, ni amplifier le processus d'activation. A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus concernant la méthode de préparation des plaquettes (Annexe n°IV).

Les plaquettes étant très facilement activables *in vitro*, nous avons testé la possibilité de les fixer immédiatement après échantillonnage pour les maintenir dans le même état d'activation que dans la poche. Nous avons utilisé le paraformaldéhyde (PF) mais les résultats de la littérature sont contradictoires quant à l'interférence du PF avec l'expression des antigènes membranaires lors de l'activation plaquettaire (82), (1). D'après certains auteurs, la fixation des plaquettes au PF doit être évitée car elle augmente l'expression de CD62P et CD63 (14). Paradoxalement, ceci ne correspond pas à nos résultats.

Mais ils sont confortés par d'autres auteurs qui ont montré que la liaison des anticorps aux plaquettes fixées est souvent moindre par rapport aux plaquettes non fixées (60) (87) (101). Nous avons montré que les résultats obtenus pour le marquage avec l'anti-CD62P sont corrélés entre les échantillons fixés et non fixés. Aujourd'hui, nous ne sommes pas en mesure de dire si le nombre de plaquettes CD62P<sup>+</sup> (activées) inférieur

observé dans nos échantillons fixés est dû à une moindre activation durant les manipulations *in vitro* ou à l'interférence du PF.

Nous avons préféré fixer les plaquettes avant leur étude par CMF (dilution plaquettaire au 1/20<sup>e</sup> dans le PF à 1% pendant 10 minutes à température ambiante ; procédé déjà validé antérieurement dans notre laboratoire). Mais cette étape est interdite dans le cas du marquage par l'Annexine-V car le PF perméabilise la membrane et permet la liaison de l'Annexine-V aux molécules de phosphatidylsérine (PS).

Les raisons de notre choix (fixation de tous les échantillons) sont multiples et concernent à la fois la démarche expérimentale et l'interprétation des résultats obtenus :

- Nous avons l'intention de réaliser toutes les expériences dans des conditions parfaitement identiques (même opérateur, même matériel, mêmes réactifs). Néanmoins, la disponibilité des appareils étant variable d'un jour à l'autre, certains délais d'attente étaient parfois prolongés.

Grâce aux échantillons fixés, nous avons montré que l'analyse peut être différée de 48 heures s'il s'agit de plaquettes en suspension dans le PF, de 2 heures s'il s'agit de plaquettes fixées et déjà marquées. D'après Michelson, ce délai de 2 heures peut être encore prolongé jusqu'à 24 heures (58). Une étude internationale récente (1999) a même montré que si les plaquettes marquées étaient à nouveau suspendues en PF à 1 %, la stabilité était de 7 jours entre 2°C et 8°C (22).

- Par ailleurs, nous savons que la fixation des plaquettes empêche toute activation artéfactuelle ultérieure et préserve la structure cellulaire (14).

Lors de la manipulation des échantillons, les plaquettes fixées conservent leur état d'activation initial. Ce pré requis est important dans notre étude (180 échantillons plaquettaires à comparer entre eux) et ce d'autant plus que notre technique est plutôt agressive pour les plaquettes puisqu'elle nécessite un double lavage (après fixation et après le contact avec l'anticorps).

## ② Il faut pouvoir estimer l'intensité de l'activation.

Les antigènes plaquettaires donnent moins de signal de fluorescence que des antigènes comparables sur des leucocytes, car les plaquettes sont de petite taille (même si les antigènes sont abondants à la surface) (27). Dans notre cas, l'utilisation du cytomètre de flux pour sélectionner la population plaquettaire et étudier une fluorescence (FL<sub>1</sub> ou FL<sub>2</sub>) à la surface de la plaquette s'est avérée aisée.

Il est important de noter la différence de signification entre les résultats exprimés en % de cellules positives et les résultats exprimés en intensité de fluorescence. Il faut prendre en compte que les plaquettes CD62P<sup>+</sup> peuvent avoir très peu d'antigènes exprimés à leur surface. L'intensité moyenne de fluorescence est donc un paramètre intéressant pour interpréter les résultats ; elle reflète le nombre moyen d'antigènes à la surface plaquettaire.

Les billes calibrées que nous avons utilisées comportaient au minimum 1400 sites antigéniques par bille (supérieur au nombre de sites plaquettaires) ; elles étaient donc inadaptées aux plaquettes. Nous avons utilisé ces résultats non pas dans l'objectif d'une quantification antigénique mais pour standardiser les intensités de fluorescence obtenues d'une expérience à l'autre (acquisition des billes systématique à chaque expérience). On sait en effet que la reproductibilité peut être assurée jour après jour par la calibration avec des billes fluorescentes (60).

### ③ Il faut utiliser un panel d'anticorps.

L'idéal est d'explorer plusieurs phénomènes différents lors de l'activation pour obtenir l'évaluation la plus précise possible des modifications induites par la préparation et la conservation des CPA.

Le marquage des plaquettes avec certains anticorps commerciaux a posé quelques problèmes : PAC1 (anticorps détectant la GPIIb/IIIa sous forme activée) et anti-CD63 (marqueur de la dégranulation lysosomale) n'ont pu être étudiés. Les hypothèses explicatives sont de deux types :

- ou la nature des échantillons était inappropriée (plasma riche en plaquettes ou suspensions plaquettaires diluées en PBS), ces anticorps étant préconisés pour une étude en sang total.
- ou les conditions d'activation plaquettaire n'étaient pas optimales (nombreuses étapes de lavage, plaquettes "réfractaires" à l'activation).

Concernant le marquage à l'Annexine-V, les conditions opératoires ont pu être définies tardivement (seulement 28 CPA étudiés) mais il en ressort que :

- les étapes de lavage doivent être supprimées car elles entraînent une modification de la taille et de la granularité des plaquettes (agrégation ?)
- la durée du marquage doit être contrôlée (maximum 2 heures dans notre étude) car il s'agit de plaquettes non fixées et le flip-flop membranaire peut se produire lors de l'incubation.

En 1999, une étude de la liaison de l'Annexine-V aux plaquettes souligne que l'intervalle de temps entre échantillonnage et cytométrie de flux doit être standardisé à 90 minutes (51).

---

Après cette étape de mise au point méthodologique, 30 donneurs ont été prélevés deux fois en cytophérése, sur deux séparateurs différents.

Le séparateur COBE Spectra équipé de la version Turbo présente une différence au niveau de l'anneau de séparation des plaquettes par rapport à la version classique 5.1 ; sa morphologie particulière permet une meilleure extraction des plaquettes en évitant le mélange du plasma riche en plaquettes avec le plasma pauvre en plaquettes. Avant son utilisation en France, l'Agence Française du Sang impose l'évaluation de cette nouvelle technologie. L'objectif de cette étude n'était pas de montrer l'efficacité de collecte supérieure pour la version Turbo (meilleur rendement plaquettaire en un temps réduit) qui a déjà été étudiée antérieurement par l'étude multicentrique européenne de 1998 (résumé en annexe).

Notre but était de comparer deux types de CPA au cours de leur durée légale de conservation (5 jours). Les paramètres sélectionnés sont des critères biologiques mesurés *in vitro* exclusivement et la notion d'efficacité transfusionnelle clinique n'a pas été abordée.

Il nous a semblé judicieux de réaliser une étude appariée. Ce type de protocole n'est pas fréquent dans la littérature et cette décision était contraignante en pratique car elle imposait deux convocations pour chaque donneur, à huit semaines d'intervalle. Mais elle permet une réelle étude comparative en s'affranchissant partiellement des variations inter-individuelles. De plus, nous avons ajouté deux éléments pour ne pas biaiser l'étude :

- les deux types de séparateurs ont été utilisés en même temps sur le site de prélèvement
- l'ordre des cytophérése était aléatoire (premier don sur l'une ou l'autre des versions).

Notre protocole d'évaluation du système Spectra version Turbo a été défini en regard des exigences de l'AFS dans le cadre de la réglementation des PSL. Le nombre de donneurs, le contrôle de la tolérance et le respect des caractéristiques propres au "CPA" nous ont été imposés. En revanche, la plupart des tests *in vitro* à réaliser au cours de la conservation étaient formulés de manière plus libre (cf page 43).

Il apparaît important d'utiliser un panel de dosages *in vitro* apportant des informations complémentaires sur les différentes propriétés plaquettaires.

Nous avons donc choisi :

- le paramètre métabolique "taux de glucose".

A J0, la valeur de ce dosage est peu informative (glucose apporté majoritairement avec la solution anticoagulante dont le volume est variable d'un CPA à l'autre) mais il est utile de contrôler le glucose résiduel à J5 pour s'assurer que les plaquettes ont un apport énergétique suffisant jusqu'à la fin de la conservation.

- le paramètre morphologique "VPM"

Les trois autres tests proposés par l'AFS (score morphologique, réponse au choc osmotique, amplitude au changement de forme) nécessitent un personnel entraîné. La détermination du VPM présente un double avantage : d'une part la mesure est automatisée et d'autre part elle nécessite peu de préparation de l'échantillon donc le risque de changement de forme plaquettaire *in vitro* est minimisé.

- les marqueurs d'activation plaquettaire qui doivent être au nombre de deux minimum :

♦ un à la surface membranaire

Le problème n'étant pas d'étudier la réactivité plaquettaire mais le statut d'activation, ceci a un impact sur le choix des marqueurs à tester et la méthodologie.

Nous avons choisi le CD62P, composant des membranes des granules alpha des plaquettes quiescentes, exprimé à la surface après sécrétion de ces granules. Il est largement retrouvé dans la littérature et même préconisé comme contrôle qualité des CPA (101) (58). Il ressort comme marqueur prédictif de viabilité *in vivo* (37).

♦ un sécrété dans le milieu extérieur ( $\beta$ TG, PF<sub>4</sub> ou sérotonine)

Nous avons ciblé l'étude de l'activation plaquettaire sur la dégranulation alpha (la sérotonine est un composant des granules denses). Nous avons étudié la sécrétion de  $\beta$ TG, marqueur spécifique des granules alpha plaquettaires, elle représente 10 % de leur contenu. C'est le marqueur le plus souvent utilisé lors des études de l'activation plaquettaire.

Il nous a paru intéressant de doser également la GMP 140 (ou CD62P soluble), dans la mesure où nous avons mesuré sa présence membranaire par CMF.

Il faut toutefois savoir qu'elle est également sécrétée par les cellules endothéliales activées, elle peut donc être retrouvée dans le plasma.



Dans la littérature, l'augmentation de CD62P soluble est parfois considérée comme un marqueur plus sensible de l'activation plaquettaire initiale que le CD62P membranaire (97) (45).

---

Notre première interrogation a porté sur la conformité réglementaire des CPA issus du nouveau procédé Turbo. Le séparateur COBE Spectra 5.1 étant déjà sur le marché depuis plusieurs années, cette question présentait un moins grand intérêt pour les poches obtenues avec cette configuration.

Les 60 CPA prélevés, conservés et analysés pendant cette étude auraient pu être transfusés, dans un autre contexte (hors protocole d'évaluation d'un nouveau PSL avant avis de la Commission). En effet, ils satisfaisaient tous aux exigences du contrôle qualité actuel : volume, contenu en plaquettes, nombre de leucocytes résiduels, pH et indice de tournoiement.

Pour les quatre poches qui ont un indice de tournoiement évalué à 2 (moyen) à partir de J3 ou J5, nous n'avons pas retrouvé, parmi les paramètres mesurés et en particulier le pH, des valeurs qui se distinguent des autres CPA.

Puis nous nous sommes inquiétés de la qualité des plaquettes obtenues, à savoir le contrôle de paramètres morphologiques, métaboliques ou antigéniques. Nous n'avons pas exploré la fonctionnalité plaquettaire.

### **Existe-t-il des paramètres montrant une altération plaquettaire due à la séparation ?**

Le VPM des plaquettes issues de Turbo est supérieur à celui des plaquettes issues de 5.1. Nous avons supposé dans un premier temps qu'il pouvait s'agir de la mesure d'agrégats plaquettaires que nous n'avions pas décelés lors de l'évaluation de l'indice de tournoiement. Mais comme cette différence de taille persiste au cours de la conservation et que l'évolution de la concentration plaquettaire dans les poches est similaire pour les deux versions, nous avons éliminé cette hypothèse.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes orientés vers la différence entre les deux anneaux de séparation. Nous savons que le procédé Turbo prélève davantage de plaquettes lors de la centrifugation. En effet, la morphologie de l'anneau de séparation Turbo doit permettre une meilleure extraction plaquettaire c'est à dire qu'il piège aussi les plaquettes proches de l'interface avec les leucocytes (ce sont les plaquettes de plus grande densité donc de plus grande taille). La différence

significative de VPM entre les deux versions dès J0 ( $p < 0,005$ ) se rapporterait donc à une différence technologique.

Nous avons observé que ce nouveau type de prélèvement de plaquettes ne provoque pas davantage de lyse puisque nos résultats concernant la LDH ne font pas apparaître de différence entre la version 5.1 et la version Turbo. Le "traumatisme" dû à la séparation est donc similaire malgré la modification de la forme du sillon dans l'anneau de séparation Turbo. Cette faible lyse plaquettaire due à la préparation (LDH proche des valeurs normales plasmatiques) influence toutefois les lésions plaquettaires ultérieures puisque nous avons trouvé une corrélation entre les résultats de J0 et ceux de J3 ( $r^2 = 0,50$ ), et à un moindre degré ceux de J5 ( $r^2 = 0,37$ ).

Hormis la différence de VPM, il existe une autre différence statistiquement significative à J0 entre les deux versions : elle concerne le % de CD62P<sup>+</sup> ( $p = 0,03$ ). Il est alors possible de postuler que la version Turbo, de par la différence de géométrie de son plateau, est moins agressive pour les plaquettes (27 % versus 31 %). Mais cette interprétation est dangereuse pour deux raisons :

- il s'agit d'une différence très faible et il est peu probable qu'elle ait une signification biologique.
- l'intensité moyenne de fluorescence n'est pas différente entre les deux versions ( $p = 0,11$ ), ce qui signifie que le nombre moyen de molécules CD62P exprimées est comparable.

Par ailleurs, on retrouve la même distribution des échantillons plaquettaires analysés, c'est à dire que la proportion des CPA "très activés", "modérément activés" et "faiblement activés" est similaire pour les deux versions.

Cette évaluation de CD62P à la surface plaquettaire nous a montré que dans tous les CPA nous dépistons une population plaquettaire activée (au minimum 6 % de la population plaquettaire totale) mais les résultats sont très variables d'un CPA à l'autre. Cette hétérogénéité est d'ailleurs retrouvée pour les facteurs solubles relargués (le coefficient de variation est proche de 50 %).

La variabilité entre les donneurs jouant un rôle majeur dans ce processus d'activation, l'étude pairée est parfaitement justifiée.

La technique de CMF nous permet d'affirmer l'existence, en mélange avec cette population activée, d'une proportion de plaquettes non activées (CD62P<sup>-</sup>) car nous avons observé sur les histogrammes de fluorescence un simple épaulement du pic vers la droite et non le déplacement du pic vers des intensités supérieures.

L'informativité de la CMF est à souligner car les deux facteurs solubles mesurés par dosages ELISA montrent seulement que la procédure de séparation a provoqué une dégranulation alpha (approche indirecte englobant la totalité de la population plaquettaire sans distinguer la proportion de plaquettes non activées). De plus, les résultats concernant la GMP140 (CD62P soluble) sont difficiles à interpréter à J0 car cette molécule peut se trouver dans le plasma du donneur après libération par les cellules endothéliales.

Nous avons observé une corrélation ( $r^2 = 0,44$ ) entre CD62P membranaire et  $\beta$ TG sécrétée. Une autre étude (79) avait souligné l'existence d'une relation entre ces deux marqueurs qui reflètent le même phénomène.

### **Existe-t-il des paramètres montrant une altération plaquettaire due à la conservation ?**

Après 5 jours de conservation à 22°C, des résultats de la littérature ont montré que le VPM reste le même ou diminue au maximum de 10 % (65).

La variation moyenne obtenue dans notre étude est de 2 à 3 % de J0 à J3 et de 1 % de J3 à J5. Les VPM sont donc relativement stables dans les CPA au cours du temps. La variation (minime) s'effectue dans le sens d'une diminution de J0 à J3 suivie d'une légère augmentation de J3 à J5. L'explication réside probablement dans l'existence d'un artefact dû à la présence d'agrégats plaquettaires à J0 (analysés comme des plaquettes) puis leur probable réversibilité partielle à J3. Ceci est confirmé par la variation de la concentration plaquettaire dans les poches : elle augmente en moyenne de 10 % entre J0 et J3. Comme les plaquettes sont des éléments cellulaires sans noyau, incapables de se diviser, cette augmentation s'explique par la disparition des agrégats. La réapparition des agrégats à J5 est possible mais il pourrait s'agir d'un effet de la "storage lesion" : le VPM des plaquettes activées ou sénescents est peut-être légèrement supérieur à celui des plaquettes quiescentes (il n'existe aucune étude publiée concernant la modification morphologique plaquettaire due au vieillissement physiologique).

Quoi qu'il en soit, la différence de taille que nous avons observée à J0 persiste et dans tous les cas les plaquettes issues de Turbo sont plus volumineuses que celles issues de 5.1.

Une hypothèse de la littérature vis à vis de ces plaquettes de grande taille avance qu'elles pourraient avoir un métabolisme plus important de par la présence de plus d'enzymes intra-cellulaires (61). Mais nous n'avons pas observé de différences concernant les paramètres métaboliques entre les deux types de CPA. L'acidification progressive observée pour tous les CPA est due à la formation d'acide lactique par la

glycolyse. En effet, le taux de glucose diminue de J0 à J5, tout en restant supérieur à 5 mmol/l en fin de conservation, c'est-à-dire dans la normalité des valeurs plasmatiques. La comparaison avec des résultats obtenus dans d'autres évaluations est rendue difficile par le fait que la quantité initiale de glucose, le volume des CPA et la quantité de plaquettes sont très différents d'une étude à l'autre. Néanmoins, on sait que les plaquettes sont non viables si le pH est inférieur à 6,2 (63). Dans aucun des cas la diminution du pH n'a compromis la viabilité plaquettaire puisque le pH minimum obtenu dans notre étude est de 6,73 à J5. Ces valeurs correspondent aux résultats attendus : supérieurs à 6,7 durant les 6 premiers jours (48).

Si ces plaquettes de grande taille ont un métabolisme comparable à celui des plaquettes de la technique de référence, on peut s'interroger sur leur éventuelle fragilité mais les résultats de l'activité LDH rapportée à la concentration plaquettaire ne sont pas différents entre les deux versions. Les valeurs obtenues sont conformes à celles de la littérature ; la LDH n'augmente pas de manière très importante (20 % d'augmentation sur 5 jours en moyenne) ce qui indique une faible lyse cellulaire pendant la conservation (79) (98).

En revanche, les résultats concernant l'activation plaquettaire évoluent de manière plus marquée (le pourcentage de plaquettes activées double de J0 à J5). Il semble évident que des plaquettes conservées deviennent activées. Mais l'étude de l'expression de CD62P membranaire montre des résultats très hétérogènes entre les donneurs, variant pour un même donneur avec le temps, et apparemment non dépendants d'un type d'aphérèse. Cette variabilité a déjà été soulignée dans la littérature (78) (17). On retrouve en effet la grande variabilité en fonction des donneurs et du type de préparation : 25 % d'activation est une moyenne calculée à J5 dans une étude de la conservation des CPA mais les résultats peuvent être compris entre 10 % et 60 % (77).

D'une manière générale, la proportion de plaquettes CD62P<sup>+</sup> augmente au cours de la conservation et l'activation causée par la préparation initiale est partiellement prédictive des résultats obtenus à J3 et J5. Il a été montré récemment que, dans la poche, l'activation plaquettaire à J1 est corrélée avec le statut d'activation à J5 (53), (79), (98). Ici, nous confirmons que le devenir de la plaquette est fortement lié à la séparation (J0). Comme on ignore encore le devenir, dans la poche, de ces plaquettes après la sécrétion des granules alpha et l'expression du CD62P membranaire, il est difficile de mesurer la conséquence de l'apparition d'une population plaquettaire activée.

La moyenne de fluorescence, reflet du nombre de sites antigéniques a tendance aussi à augmenter au cours de la conservation, le rapport R variant de 11 à 25 (5.1) ou de 10 à 22 (Turbo) en moyenne. Cette observation est propre à notre étude puisqu'en 1995 il a été montré que la moyenne de fluorescence (CD62P<sup>+</sup>) restait stable pendant 5 jours (21). Il faut prendre en compte que cette fluorescence mesurée est sûrement dépendante de la procédure de séparation et des conditions opératoires choisies pour l'évaluer. En effet, les résultats sont difficilement comparables d'un laboratoire à l'autre malgré l'utilisation des billes (séparateur, nature de la poche, protocole expérimental et réactifs différents).

Dans ce contexte, quel est l'apport informatif des autres marqueurs d'activation ?

Lors de l'activation plaquettaire peut se produire un flip-flop membranaire à l'origine de l'exposition de la PS sur le côté externe de la membrane, mesuré par la liaison de l'Annexine-V. Les CPA étudiés avec ce marqueur représentent un très petit échantillon à partir duquel on ne peut tirer que de fragiles conclusions. On observe toutefois une augmentation régulière de la proportion de plaquettes Annexine-V<sup>+</sup> au cours de la conservation et il n'y a pas de différence significative entre les deux versions d'aphérèse. Mais cette proportion reste faible (maximum de 17 %) par rapport aux plaquettes CD62P<sup>+</sup> (maximum de 81 %).

Trois hypothèses peuvent expliquer cette disproportion. Le test détectant l'expression d'une surface procoagulante est peut-être moins sensible pour mesurer une activation plaquettaire ou alors il s'agit d'un phénomène plus tardif, reflet d'une apoptose, comme nous l'avons vu dans la littérature (53). On peut également supposer que ces deux phénomènes sont dus à des stimuli différents et ces deux approches de l'activation plaquettaire par CMF (PS et CD62P membranaires) seraient complémentaires, les résultats n'étant pas corrélés ( $r^2 < 0,03$ ). Quoi qu'il en soit, nos résultats sont proches de ceux d'une autre évaluation de CPA montrant moins de 20 % de plaquettes Annexine-V<sup>+</sup> jusqu'à J6 (51).

Comme les conditions opératoires sont inconciliables pour l'étude de l'expression de ces deux molécules (CD62P et PS), nous n'avons pu réaliser un double marquage et nous ne pouvons savoir si les plaquettes présentant une surface procoagulante ont également subi un phénomène de dégranulation alpha.

En parallèle de l'étude des marqueurs à la surface plaquettaire, nous avons également dosé des marqueurs d'activation solubles dans les CPA.

Si l'on admet comme la littérature le suggère (70) (5), que le CD62P membranaire disparaît de la surface plaquettaire après un certain temps (durée et mécanismes

encore inconnus aujourd'hui), son dosage dans les surnageants devrait refléter l'activation préalable. Les valeurs normales plasmatiques de la GMP140 (CD62P soluble) étant proches de 200 ng/ml, la sécrétion n'est pas importante jusqu'à J3 (moyenne de 218 ng/ml), la moyenne étant proche de 300 ng/ml à J5. Une étude antérieure avait montré un état quiescent plaquettaire à J0 (pas de grande stimulation due à la préparation) mais une élévation de la concentration en GMP140 dès J3 (X3) et à J5 (X8) (21). Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux que nous avons obtenus alors que les proportions de plaquettes CD62P<sup>+</sup> sont comparables. De plus, la méthode de dosage utilisée est la même que la nôtre (kit ELISA commercialisé par la société TAKARA).

Nous n'avons pas observé de relation ( $r^2 < 0,2$ ) entre l'expression membranaire de CD62P et son relargage, à la différence d'autres observations réalisées sur des concentrés plaquettaires standards ( $r^2 = 0,55$ ) (45). Cette absence de corrélation peut s'expliquer dans la mesure où GMP140 et CD62P sont les deux mêmes molécules dans deux états différents (une à la surface membranaire et l'autre sous forme libre dans le surnageant). Il faut considérer également que le kit utilisé est susceptible de doser 3 variants : deux formes transmembranaires (de différentes tailles, car il faut tenir compte de la protéolyse) et une forme cytoplasmique (sans domaine transmembranaire) ; il s'agit donc d'une approche globale des molécules CD62P solubles sécrétées. De plus, la présence de CD62P membranaire est le résultat de deux phénomènes en équilibre : la fusion de la membrane des granules alpha lors de la sécrétion et le clivage de la molécule qui se retrouve alors sous forme libre. Nous ignorons dans quelle mesure il existe un équilibre entre expression et clivage membranaires. Un phénomène d'internalisation plaquettaire à l'intérieur du système canaliculaire ouvert à la surface n'est pas exclu et nous ne connaissons pas la demi-vie plasmatique de cette molécule.

Nos résultats concernant la  $\beta$ TG, autre marqueur de sécrétion alpha, (moyennes de 6500 UI/ml à J0 et 16400 UI/ml à J5) montrent une progression similaire à celle d'une autre étude réalisée sur 6 CPA (4500 UI/ml à J0 et 22300 UI/ml à J5) (10). Comme l'écart type obtenu était très important, nous avons calculé le rapport concentration  $\beta$ TG / concentration plaquettaire mais la disparité des résultats ne s'est pas estompée. Elle peut être due aux difficultés techniques rencontrées (le kit ELISA étant adapté aux dosages sériques, nous avons dû diluer les surnageants au 1/1000<sup>e</sup> avant dosage) ou à la grande disparité fonctionnelle des échantillons plaquettaires. Deux études antérieures (1981 et 1992) avaient montré une corrélation inverse entre le relargage de  $\beta$ TG et la baisse du pH (78), (93) puisque l'acidose progressive

provoque une dégranulation alpha. Dans notre étude, il n'y a pas de corrélation entre ces deux paramètres ( $r^2 < 0,02$ ) (résultats non détaillés).

Nous avons montré que ces deux dosages de  $\beta$ TG et GMP140 sont faiblement corrélés entre eux aux trois temps de l'étude ( $0,16 < r^2 < 0,37$ ) et cette liaison était supérieure ( $r^2 = 0,47$ ) dans une autre évaluation de J0 à J8 (45). Les explications possibles, hors problème technique, sont d'une part la dégradation de ces deux molécules dans les CPA (elles subissent peut-être un catabolisme dont la cinétique est différente) et d'autre part l'hétérogénéité possible du contenu des granules alpha.

Face à ces résultats, l'intérêt de la CMF semble évident malgré les contraintes techniques car elle analyse les plaquettes de manière individuelle. Le marqueur CD62P membranaire est très attractif de part sa grande sensibilité et son implication possible dans le devenir de la plaquette *in vivo*. Quant aux dosages de facteurs solubles, ils présentent un double avantage : une logistique plus simple (congélation des échantillons avant analyse) et une approche globale du CPA mais nous manquons aujourd'hui de connaissances sur leur réelle informativité.

Nous avons constaté la forte influence des conditions initiales de préparation sur l'activation plaquettaire au cours de la conservation. Il semble donc inutile d'instaurer un contrôle qualité itératif durant la phase de conservation.

On sait que la durée de vie des plaquettes transfusées diffère selon les individus receveurs, hors contexte de destruction par des anticorps immuns ou de séquestration splénique. Cette différence est-elle expliquée par la qualité des plaquettes ?

Quel est le devenir post-transfusionnel des plaquettes de plus grande taille ?

La durée de vie des plaquettes activées est-elle raccourcie ? Est-ce que leur réponse aux stimuli durant préparation et conservation les "fragilise" et entraîne une mort plaquettaire prématurée ?

Il a été montré que l'expression de CD62P membranaire entraîne la liaison des plaquettes aux leucocytes ce qui provoque leur disparition prématurée de la circulation (39), (77). Cependant, le CD62P membranaire pourrait être clivé *in vivo*, comme une expérience chez le babouin l'a mis en évidence (5).

Le phénomène d'expression d'une surface procoagulante joue peut-être un rôle dans l'induction d'une allo-réactivité puisqu'on connaît certaines conséquences de l'expression de PS. C'est un moyen pour les cellules macrophagiques de reconnaître les cellules apoptotiques et de présenter leurs antigènes, après processing, aux

cellules de l'immunité. On ignore si le flip-flop observé pour les plaquettes est un phénomène réversible. De la même manière on peut s'interroger sur les implications cliniques éventuelles de ces modifications de la surface membranaire vis à vis des phénomènes de thrombose.

Les bénéfices possibles de mesurer l'activation au sein des CPA pourraient être non seulement l'évaluation objective de leur conservation mais aussi l'ajustement thérapeutique ultérieur de la posologie transfusionnelle. En effet, l'idéal serait d'identifier les dosages pour lesquels des corrélations avec les résultats *in vivo* peuvent être établis et définir ainsi un ou plusieurs marqueur(s) prédictif(s) de survie. Le choix de ce marqueur pourrait être adapté au contexte clinique (transfusion préventive ou curative).

Une autre perspective possible est l'étude des plaquettes chez le donneur après l'aphérèse (une faible quantité de plaquettes est réinjectée avec les autres cellules sanguines lors de l'aphérèse).

Il serait en effet très intéressant d'explorer le devenir *in vivo* des plaquettes activées, chez le donneur et chez le receveur. En général, ce type d'investigation comprend trois étapes : une étude *in vitro* initiale suivie d'une étude de survie chez des volontaires sains et enfin une étude sur des patients. Notre investigation actuelle apporte seulement des éléments de réponse pour la première étape.



THESE SOUTENUE PAR : CHRISTELLE CORNE

**TITRE : Étude de la qualité des concentrés plaquettaires d'aphérèse (CPA) dans le cadre de la validation d'un nouveau processus de séparation COBE Spectra Turbo.**

## CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons comparé des CPA issus de deux séparateurs COBE Spectra différents (version 5.1 et version Turbo), dans le cadre d'un protocole de validation. La version Turbo permet une meilleure extraction plaquettaire mais n'a pas encore l'autorisation d'être utilisée en France. Trente donneurs volontaires en cytophérèse ont été prélevés sur cette nouvelle version et sur la version de référence (total de 60 CPA). Le protocole défini par l'Agence Française du Sang imposait trois temps d'étude au cours de la conservation (J0, J3 et J5).

Nos résultats montrent que tous les CPA sont conformes aux normes AFS et auraient pu être transfusés. Le paramètre morphologique VPM souligne la supériorité en taille des plaquettes issues de la version Turbo ; cette différence pourrait être due à la technologie d'extraction utilisée. Quant aux paramètres métaboliques étudiés, ils sont conformes aux résultats attendus (acidose métabolique progressive).

La qualité des plaquettes a été appréciée par les marqueurs d'activation préconisés dans le protocole (CD62P et  $\beta$ TG) et un témoin de lyse plaquettaire, la LDH. Comme il n'y a pas de normes ni de références dans ce domaine, nous avons profité de ce protocole pour analyser les paramètres susceptibles d'influencer ces tests *in vitro* et les comparer à d'autres marqueurs décrits dans la littérature tels que CD62P soluble et liaison de l'Annexine-V.

Nos résultats montrent des signes d'activation plaquettaire dans tous les CPA avec les marqueurs CD62P membranaire, CD62P soluble et  $\beta$ TG. Ceux-ci sont très variables d'un donneur à l'autre et augmentent pendant le temps de conservation. Dans certaines observations, plus de 70 % des plaquettes présentent des signes d'activation. Ces trois marqueurs reflètent la dégranulation alpha mais on retrouve seulement une corrélation entre CD62P membranaire et  $\beta$ TG. De nombreux facteurs interviennent sur ces différents paramètres, après la dégranulation proprement dite, et peuvent expliquer ces résultats.

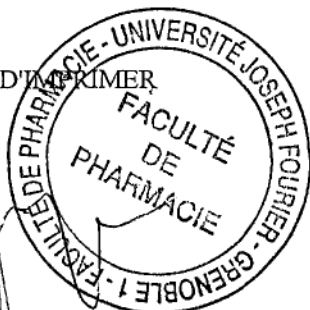
La liaison de l'Annexine-V sur les plaquettes reflète une activation intense et prolongée ; elle pourrait être aussi un témoin de mort plaquettaire. Le taux de plaquettes Annexine-V<sup>+</sup> reste inférieur à 20 % même à J5. L'autre indicateur de mort cellulaire qu'est la LDH reste également faible, évoluant peu dans le temps. Ces deux marqueurs témoignent donc d'une bonne survie plaquettaire tout au long de la conservation.

En conclusion, plusieurs tests sont à notre disposition pour mesurer l'activation plaquettaire. D'autres essais sont encore nécessaires pour mieux les standardiser et apprécier leur signification dans le devenir des plaquettes *in vivo*. En ce qui concerne le protocole de validation Turbo, il n'y a pas de différence significative avec la version de référence.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER  
Grenoble, le

LE DOYEN

P. DEMENGE



LE PRÉSIDENT DE THESE

Professeur A. FAVIER

# *Références bibliographiques*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ABRAMS C., SHATTIL S.J. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders.  
Thromb. Haemost., 1991, 65 : 467-473.
2. AZORSA D.O., MOOG S., RAVANAT C. et al. Measurement of GPV released by activated platelets using a sensitive immunocapture ELISA. Its use to follow platelet storage in transfusion.  
Thromb. Haemost., 1999, 81 : 131-138.
3. BACHELOT C., FALET H., RENDU F. Récepteurs et mécanismes d'activation plaquettaire.  
STV, 1995, 7 : 39-44.
4. BELLUCCI S. Physiologie plaquettaire, *In* : Encycl. Méd. Chir., Elsevier, Paris., 1991, 13000F-10 : 1-7.
5. BERGER G., HARTWELL D.W., WAGNER D.D. P-selectin and platelet clearance.  
Blood, 1998, 92 : 4446-4452.
6. BERTOLINI F., MURPHY S. A multicenter evaluation of reproductibility of swirling in platelet concentrates.  
Transfusion, 1994, 34 : 796-801.
7. BLOCKMANS D., DECKMYN H., VERMYLEN J. Platelet activation.  
Blood Rev., 1995, 9 : 143-156.
8. BOCK M., GAWAZ M.P., DIETZLER A., HEIM M.U., MEMPEL W. Single donor platelet concentrates : changes of surface glycoproteins during storage.  
Haemostasis, 1994, 24 : 230-235.
9. BOCK M., GAWAZ M.P., HEIM M.U., MEMPEL W. Qualitätskontrolle gelagerter Thrombozytenkonzentrate mittels Durchflusszytometrie.  
Transfusionsmedizin, 1994, 32 : 397-400.
10. BOCK M., GLASER A., PFOSSER A., SCHLEUNING M., HEIM M.U., MEMPEL W. Storage of single donor platelet concentrates : metabolic and functional changes.  
Transfusion, 1993, 33 : 311-315.
11. BODE A.P. Platelet activation may explain the storage lesion in platelet concentrates.  
Blood Cells, 1990, 16 : 109-126.
12. BODE A.P., MILLER D.T., TOFFALETTI J. Plasma levels of ionized and total calcium during storage of citrated platelet concentrates.  
Transfusion, 1989, 29 : 534-538.
13. BONEU B., CAZENAVE J.P. Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose, deuxième édition. Boehringer Ingelheim France, Reims, 1997.
14. CAHILL M.R., MACEY M.G., NEWLAND A.C. Fixation with formaldehyde induces expression of activation dependent platelet membrane glycoproteins, P-selectin (CD62) and GP53 (CD63).  
Br. J. Haematol., 1993, 84 : 527-529.

15. CHERNOFF A., SNYDER E.L. The cellular and molecular basis of the platelet storage lesion : a symposium summary.  
*Transfusion*, 1992, 32 : 386-390.
16. CONTRERAS M. Final statement from the consensus conference on platelet transfusion.  
*Transfusion*, 1998, 38 : 796-797.
17. CORASH L. Measurement of platelet activation by fluorescence-activated flow cytometry.  
*Blood Cells*, 1990, 160 : 97-108.
18. COX D. Methods for monitoring platelet function.  
*Am. Heart. J.*, 1998, 135 : 160-169.
19. DACHARY-PRIGENT J., FREYSSINET J.M., PASQUET J.M., CARRON J.C., NURDEN A.T. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation : a flow cytometric study showing a role for free sulfhydryl groups.  
*Blood*, 1993, 81 : 2554-2565.
20. DACHARY-PRIGENT J., PASQUET J.M., FREYSSINET J.M., NURDEN A.T. Calcium involvement in aminophospholipid exposure and microparticle formation during platelet activation : a study using  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitors.  
*Biochemistry*, 1995, 34 : 11625-11634.
21. DIVERS S.G., KANNAN K., STEWART R.M. et al. Quantitation of CD62, soluble CD62, and lysosome-associated membrane proteins 1 and 2 for evaluation of the quality of stored platelet concentrates.  
*Transfusion*, 1995, 35 : 292-297.
22. DUMONT L.J., VANDENBROEKE T., AULT K.A. et al. Platelet surface P-Selectin measurements in platelet preparations : an international collaborative study.  
*Transfus. Med. Rev.*, 1999, 13 : 31-42.
23. DUNLOP L.C., SKINNER M.P., BENDALL L.J. et al. Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein.  
*J. Exp. Med.*, 1992, 175 : 1147-1150.
24. DZIK W.H., CUSACK W.F., SHERBURNE B., KICKLER T. The effect of prestorage white cell reduction on the function and viability of stored platelet concentrates.  
*Transfusion*, 1992, 32 : 334-339.
25. ENGELFRIET C.P., REESINK H.W. The official requirements for platelet concentrates.  
*Vox Sang.*, 1998, 75 : 308-317.
26. FIJNHEER R., MODDERMAN P.W., VELDMAN H. et al. Detection of platelet activation with monoclonal antibodies and flow cytometry. Changes during platelet storage.  
*Transfusion*, 1990, 30 : 20-25.
27. FREEDMAN J., LAZARUS A.H. Applications of flow cytometry in transfusion medicine.  
*Transfus. Med.*, 1995, 9 : 87-109.
28. GEORGE J.N. Changes in platelet membrane glycoproteins during blood bank storage.  
*Blood Cells*, 1992, 18 : 501-511.
29. GIGOUT T., DIDELON J., LATGER V. et al. Nouveau test automatique d'étude de la réponse des plaquettes aux variations de pression osmotique : application à l'évaluation de la viabilité des concentrés plaquettaires.  
*Transfus. Clin. Biol.*, 1998, 5 : 336-345.

30. GOLLEHON T.J., KING D.E., CRAIG F.E. Does hyperconcentration result in platelet activation ?  
*Vox Sang.*, 1998, *75* : 124-127.
31. GULLIKSSON H. Adenylate kinase as a marker for platelet lysis.  
*Transfusion*, 1990, *30* : 536-540.
32. GUTENSOHN K., BARTSCH N., KUEHNL P. Flow cytometric analysis of platelet membrane antigens during and after continuous flow plateletpheresis.  
*Transfusion*, 1997, *37* : 809-815.
33. GYONGYOSSY-ISSA M.I.C., BLACK T., DEVINE D.V. Coagulation factor activation in stored platelet concentrates is modulated by the platelets.  
*Vox Sang.*, 1996, *70* : 76-85.
34. HARRISSON P., CRAMER E.M. Platelet alpha granules.  
*Blood Rev.*, 1993, *7* : 52-62.
35. HOGMAN C.F. Routine quality assurance requirements for apheresed platelets.  
*Transfus. Sci.*, 1993, *14* : 85-88.
36. HOLME S., MURPHY S. Platelet storage at 22°C for transfusion : interrelationship of platelet density and size, medium pH, and viability after in vivo infusion.  
*J. Lab. Clin. Med.*, 1983, *101* : 161-174.
37. HOLME S., SWEENEY J.D., SAWYER S., ELFATH M.D. The expression of P-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates : relationship to loss of in vivo viability.  
*Transfusion*, 1997, *37* : 12-17.
38. HOLMSEN H. Platelet metabolism and activation.  
*Semin. Hematol.*, 1985, *22* : 219-240.
39. JY W., HORSTMAN L.L., PARK H., MAO W.W., VALANT P., AHN Y.S. Platelet aggregates as markers of platelet activation : characterization of flow cytometric method suitable for clinical applications.  
*Am. J. Hematol.*, 1998, *57* : 33-42.
40. KESTIN A.S., ELLIS A.P., BARNARD M.R., ERRICETTI A., ROSNER B.A., MICHELSON A.D. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity.  
*Circulation*, 1993, *88* : 1502-1511.
41. KILKSON H., HOLME S., MURPHY S. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22°C.  
*Blood*, 1984, *64* : 406-414.
42. KLINGER M.H.F. The storage lesion of platelets : ultrastructural and functional aspects.  
*Ann. Hematol.*, 1996, *73* : 103-112.
43. KLINGER M.H.F., KLUTER H. Morphological changes in thrombocytes during blood bank storage. An ultrastructural morphometric study.  
*Ann. Anat.*, 1993, *175* : 163-170.
44. KOERNER T.A.W., CUNNINGHAM M.T., ZHANG D.S. The role of membrane lipid in the platelet storage lesion.  
*Blood Cells*, 1992, *18* : 481-497.

45. KOSTELIJK E.H., FIJNHEER R., NIEUWENHUIS H.K., GOUWEROK C.W.N., DE KORTE D. Soluble P-selectin as parameter for platelet activation during storage. *Thromb. Haemost.*, 1996, 76 : 1086-1089.
46. KUHNE T., HORNSTEIN A., SEMPLE J., CHANG W., BLANCHETTE V., FREEDMAN J. Flow cytometric evaluation of platelet activation in blood collected into EDTA vs Diatube-H, a sodium citrate solution supplemented with theophylline, adenosine and dipyridamole. *Am. J. Hematol.*, 1995, 50 : 40-45.
47. LARSEN E., CELI A., GILBERT G.E. et al. PADGEM protein : a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*, 1989, 59 : 305-312.
48. LAURENCET F.M., DOUCET A., LYDIATE V. et al. Quality evaluation of plateletpheresis using the new Amicus (Baxter) cell separator : evolution of CD62 expression. *J. Clin. Apheresis*, 1998, 13 : 47-55.
49. LEVY-TOLEDANO S., DUPUY E. Physiologie de l'hémostase primaire. In : SAMPOL J., ARNOUX D., BOUTIERE B. Manuel d'hémostase. Elsevier, Paris, 1995 : 19-35.
50. MASSE M. Qualité des produits plaquettaires : méthodes actuelles d'exploration in vitro. *Transfus. Clin. Biol.*, 1995, 2 : 79-84.
51. MATSUBAYASHI H., WEIDNER J., MIRAGLIA C.C., MCINTYRE J.A. Platelet membrane early activation markers during prolonged storage. *Thromb. Res.*, 1999, 93 : 151-160.
52. MCEVER R.P. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells*, 1990, 16 : 73-83.
53. METCALFE P., WILLIAMSON L.M., REUTELINGSPERGER C.P.M., SWANN I., OUWEHAND W.H., GOODALL A.H. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage : a comparative flow cytometric study of different production methods. *Br. J. Haematol.*, 1997, 98 : 86-95.
54. METZELAAR M.J., CLEVERS H.C. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb. Haemost.*, 1992, 68 : 378-382.
55. METZELAAR M.J., KORTEWEG J., SIXMA J.J., NIEUWENHUIS H.K. Comparison of platelet membrane markers for the detection of platelet activation in vitro and during platelet storage and cardiopulmonary bypass surgery. *J. Lab. Clin. Med.*, 1993, 121 : 579-587.
56. METZELAAR M.J., SIXMA J.J., NIEUWENHUIS H.K. Detection of platelet activation using activation specific monoclonal antibodies. *Blood Cells*, 1990, 16 : 85-96.
57. MICHELSON A.D. Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry : methods and clinical applications. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 1994, 5 : 121-131.
58. MICHELSON A.D. Flow cytometry : a clinical test of platelet function. *Blood*, 1996, 87 : 4925-4936.

59. MICHELSON A.D., BARNARD M.R., HECHTMAN H.B. et al. In vivo tracking of platelets : circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93 : 11877-11882.
60. MICHELSON A.D., SHATTIL S.J. The use of flow cytometry to study platelet activation. In : WATSON S.P., AUTHI K.S., Platelets, Oxford University Press, Oxford, 1996.
61. MOROFF G., FRIEDMAN A., ROBKIN-KLINE L. Factors influencing changes in pH during storage of platelet concentrates at 20-24°C.  
Vox Sang., 1982, 42 : 33-45.
62. MOROFF G., HOLME S. Concepts about current conditions for the preparation and storage of platelets.  
Transfus. Med. Rev., 1991, 5 : 48-59.
63. MURPHY S. Initial validation and quality control of platelet concentrates prepared by apheresis.  
Transfus. Sci., 1993, 14 : 89-94.
64. MURPHY S. Platelet function, kinetics, and metabolism : impact on quality assessment, storage, and clinical use. In : Apheresis : principles and practices, McLEOD B.C., Bethesda, 1997 : 123-139.
65. MURPHY S., REBULLA P., BERTOLINI F. et al. In vitro assessment of the quality of stored platelet concentrates.  
Transfus. Med., 1994, 8 : 29-36.
66. MURPHY S., SHIMIZU T., MIRIPOL J. Platelet storage for transfusion in synthetic media : further optimization of ingredients and definition of their roles.  
Blood, 1995, 86 : 3951-3960.
67. NURDEN A.T., BIHOUR C., JALLU V., DACHARY-PRIGENT J., HOURDILLE P. Markers of platelet activation in vivo.  
Nouv. Rev. Fr. Hematol., 1993, 35 : 251-252.
68. NURDEN A.T., CAEN J.P. Les glycoprotéines plaquettaires : vingt ans après.  
M.S, Med. Sci., 1995, 11 : 1021-1026.
69. NURDEN P. Bidirectional trafficking of membrane glycoproteins following platelet activation in suspension.  
Thromb. Haemost., 1997, 78 : 1305-1315.
70. NURDEN P., DURRIEU-JAIS C., NURDEN A. Applications cliniques actuelles d'une activation plaquettaire par cytométrie en flux.  
STV, 1997, 9 : 441-448.
71. OWENS M., HOLME S., HEATON A., SAWYER S., CARDINALI S. Post-transfusion recovery of function of 5 day stored platelet concentrates.  
Br. J. Haematol., 1992, 80 : 539-544.
72. PARMENTIER S., KAPLAN C., CATIMEL B., MCGREGOR J.L. New families of adhesion molecules play a vital role in platelet functions.  
Immunol. Today, 1990, 11 : 225-227.
73. PEDIGO M., WUN T., PAGLIERONI T. Removal by white cell-reduction filters of activated platelets expressing CD62.  
Transfusion, 1993, 33 : 930-935.

74. RAO G.H.R, ESCOLAR G., WHITE J.G. Biochemistry, physiology, and function of platelets stored as concentrates.  
*Transfusion*, 1993, 33 : 766-777.
75. RIBEIRO A., SWANN J.C., BERNDT M.C. Alterations of the levels of glycoproteins Ib-IX and IIb-IIIa in platelets stored at 22°C.  
*Thromb. Res.*, 1992, 66 : 619-627.
76. RINDER H.M., MURPHY M., AULT K.A. Quantitation of platelet activation during storage : evidence that activated platelets fail to circulate following transfusion.  
*Blood*, 1988, 72 : 283.
77. RINDER H.M., MURPHY M., MITCHELL J.G., STOCKS J., AULT K.A., HILLMAN R.S. Progressive platelet activation with storage : evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion.  
*Transfusion*, 1991, 31 : 409-414.
78. RINDER H.M., SNYDER E.L. Activation of platelet concentrate during preparation and storage.  
*Blood Cells*, 1992, 18 : 445-456.
79. RINDER H.M., SNYDER E.L., BONAN J.L., NAPYCHANK P.A., MALKUS H., SMITH B.R. Activation in stored platelet concentrates : correlation between membrane expression of P-selectin, glycoprotein IIb/IIIa, and  $\beta$ -thromboglobulin release.  
*Transfusion*, 1993, 33 : 25-29.
80. RUF A., PATSCHEKE H. Flow cytometric detection of activated platelets : comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression.  
*Thromb. Haemost.*, 1995, 21 : 146-151.
81. SAFFROY R., BACHELOT C., RENDU F. Anticorps monoclonaux antiglycoprotéines plaquettaires : propriétés et intérêts pratiques.  
*Ann. Biol. Clin.*, 1995, 53 : 97-105.
82. SCHMITZ G., ROTHE G., RUF A. et al. European working group on clinical cell analysis : consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function.  
*Thromb. Haemost.*, 1998, 79 : 885-896.
83. SCHOONEMAN F. Les concentrés de plaquettes d'aphérèse : méthodes de préparation.  
*Transfus. Clin. Biol.*, 1994, 6 : 489-499.
84. SCHOONEMAN F., CLAISE C. The storage quality of apheresis platelets. Analysis of results from seven different cell separators.  
*Transfus. Sci.*, 1996, 17 : 559-574.
85. SCHROIT A.J., ZWAAL R.F.A. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1071 : 313-329.
86. SHANWELL A., GULLIKSON H., BERG B.K., JANSSON B.A., SVENSSON L.A. Evaluation of platelets prepared by apheresis and stored for 5 days : In vitro and in vivo studies.  
*Transfusion*, 1989, 29 : 783-788.
87. SHATTIL S.J., CUNNINGHAM M., HOXIE J.A. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry.  
*Blood*, 1987, 70 : 307-315.



88. SHATTIL S.J., HOXIE J.A., CUNNINGHAM M., BRASS L.F. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.*, 1985, *260* : 11107-11114.
89. SHATTIL S.J., WEISEL J.W., KIEBER-EMMONS T. Use of monoclonal antibodies to study the interaction between an integrin adhesion receptor, GPIIb-IIIa, and its physiological ligand, fibrinogen. *ImmunoMethods*, 1992, *1* : 53-63.
90. SLICHTER S.J. Controversies in platelet transfusion therapy. *Annu. Rev. Med.* 1980, *31* : 509-540.
91. SLOAND E.M., KLEIN H.G. Effect of white cells on platelets during storage. *Transfusion*, 1990, *30* : 333-338.
92. SNYDER E.L. Release of  $\beta$ -thromboglobulin during storage of platelet concentrates. *Vox Sang.*, 1981, *40* : 115-116.
93. SNYDER E.L., HEZZEY A., KATZ A.J., BOCK J. Occurrence of the release reaction during preparation and storage of platelet concentrates. *Vox Sang.* 1981, *41* : 172-177.
94. SNYDER E.L., POPE C., FERRI P.M., SMITH E.O., WALTER S.D., EZEKOWITZ M.D. The effect of mode of agitation and type of plastic bag on storage characteristics and in vivo kinetics of platelet concentrates. *Transfusion*, 1986, *26* : 125-130.
95. SOWEMIMO-COKER S.O., KIM A., TRIBBLE E., BRANDWEIN H.J., WENZ B. White cell subsets in apheresis and filtered platelet concentrates. *Transfusion*, 1998, *38* : 650-657.
96. STENBERG P.E., MCEVER R.P., SHUMAN M.A., JACQUES Y.V., BAINTON D.F. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J. Cell Biol.*, 1985, *101* : 880-886.
97. STOHLAWETZ P., HERGOVICH N., STIEGLER G. et al. Differential induction of P-selectin expression on platelets by two cell separators during plateletpheresis and the effect of gender on the release of soluble P-selectin. *Transfusion*, 1998, *38* : 24-30.
98. STOHLAWETZ P., HORVATH M., PERNERSTORFER T. et al. Effects of nitric oxide on platelet activation during plateletpheresis and in vivo tracking of biotinylated platelets in humans. *Transfusion*, 1999, *39* : 506-514.
99. STUART M.C.A., BEVERS E.M., COMFURIUS P., ZWAAL R.F.A., REUTELINGSPERGER C.P.M., FREDERIK P.M. Ultrastructural detection of surface exposed phosphatidylserine on activated blood platelets. *Thromb. Haemost.*, 1995, *74* : 1145-1151.
100. SUN J., BIRD P., SALEM H.H. Interaction of Annexin V and platelets : effects on platelet function and protein S binding. *Thromb. Res.*, 1993, *69* : 289-296.
101. TRIULZI D.J., KICKLER T.S., BRAINE H.G. Detection and significance of alpha granule membrane protein 140 expression on platelets collected by apheresis. *Transfusion*, 1992, *32* : 529-533.

102. TSCHOEPE D., SPANGENBERG P., ESSER J. et al. Flow cytometric detection of surface membrane alterations and concomitant changes in the cytoskeletal actin status of activated platelets.  
Cytometry, 1990, *11* : 652-656.
103. WALZ D.A. Platelet-released proteins as molecular markers for the activation process.  
Thromb. Haemost., 1984, *10* : 270-279.
104. YEO E.L., SHEPPARD J.A.I., FEUERSTEIN I.A. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel model).  
Blood, 1994, *83* : 2498-2507.
105. ZWAAL R.F.A., COMFURIUS P., BEVERS E.M. Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes.  
Biochem. Soc. Trans., 1993, *21* : 248-253.

# *Annexes*

## LISTE DES ANNEXES

- I Photographie du séparateur COBE Spectra
- II Formulaire de consentement destiné au donneur
- III Résumé de l'étude multicentrique européenne
- IV Bilan méthodologique issu de la littérature
- V Extrait du Journal Officiel concernant les caractéristiques des produits sanguins labiles à usage thérapeutique (30 novembre 1993).

# ANNEXE I



**COBE Spectra**<sup>™</sup>  
A P H E R E S I S   S Y S T E M

## ANNEXE II

# FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT A L'ETUDE D'EVALUATION DU SEPARATEUR SPECTRA TURBO

Le système spectra Turbo correspond à une amélioration de la version 5.1 spectra actuellement utilisée. Ce système possède déjà le marquage CE.

Cette étude consiste à comparer la qualité des plaquettes collectées par ces deux systèmes de façon à vérifier qu'elles seront efficaces après transfusion chez un malade.

Pour cela, il est nécessaire de réaliser, chez un même donneur, deux prélèvements d'aphérèse à huit semaines d'intervalle minimum.

Lors de ces prélèvements, les analyses habituelles du don du sang seront effectuées, et les éventuels résultats anormaux vous seront communiqués.

J'accepte donc d'être un des participants à cette évaluation et je suis informé (e) que les plaquettes collectées pendant cette étude ne seront pas utilisées à des fins thérapeutiques mais bien en vue d'une étude de laboratoire visant à optimiser la qualité des plaquettes.

Je soussigné (e) .....  
accepte de prendre part à cette étude.

Fait à la Tronche, le .....

Signature

(précédée de la mention "Lu et approuvé")

### ANNEXE III

#### Abstract submitted to the ASFA Conference 1998 May 14-16, St-Petersburg (USA)

MULTICENTER EVALUATION OF THE COBE SPECTRA LRS TURBO FOR COLLECTING LEUKOREduced PLATELETS. DA Jones, NBS Trent Centre, Sheffield, UK ; P. Drillat, ETS de l'Isère et de la Savoie, La Tronche, France; R Verheyden, BTC Leuven, Belgium; J Zingsem, UKE Erlangen, Germany; and H Bunkens, COBE BCT, Zaventem, Belgium.

**Background** : The LRS Turbo System was developed to improve the efficiency of platelet collections on the Cobe Spectra. The aim of this study was to evaluate platelet collection efficiency and leukocyte reduction of the Spectra LRS Turbo as compared to the standard Spectra LRS (V.5).

**Methods** : Four centers participated in the study. One center (A) used a paired study design ; in the other centers donors were randomly assigned to either the standard V.5 or the LRS Turbo System. Platelet collections were performed following the centers' routine procedures. Identical procedures were used on both systems. Donor's platelet counts were determined before and after the procedure using an automated counter (A=Celldyn 3000, B=ST2 Minos ABX, C=Sysmex K4500, D=Technicon H1Junior). Platelet yields (Y) were measured by the same counters ; residual white cells were counted using the Nageotte chamber. Collection efficiency (CE) was calculated as  $Y / [\text{volume processed} \times (\text{pre} + \text{postcount})/2]$ .

**Results** : Results are shown as means  $\pm$  SD in the table below. Yields are expressed as Y per min ( $10^9/\text{min}$ ). White cell counts were analyzed on pooled data from all centers. Median values of residual white cells were  $4.2 \times 10^4$  and  $4.3 \times 10^4$  per product for V.5 and the LRS Turbo respectively. None of the products contained more than  $1 \times 10^6$  WBC.

**Conclusion** : The LRS Turbo showed significantly improved collection efficiencies (by 9 to 22%) over Spectra V.5, while maintaining the very good leukocyte reduction of V.5.

	Center A( SN)		Center B (SN)		Center C (DN)		Center D (DN)	
	V.5	Turbo	V.5	Turbo	V.5	Turbo	V.5	Turbo
n	28	28	27	30	71	76	29	30
Plt pre $10^9/l$	$287 \pm 30$	$284 \pm 27$	$249 \pm 39$	$237 \pm 44$	$237 \pm 40$	$229 \pm 42$	$298 \pm 34$	$286 \pm 36$
Y ( $10^9$ ) per min	$6.2 \pm 1.2$	$7.6^{**} \pm 1.5$	$5.2 \pm 1.0$	$5.5 \pm 1.1$	$5.6 \pm 1.2$	$6.2^{**} \pm 1.5$	$7.4 \pm 1.1$	$7.9 \pm 1.2$
CE %	$55 \pm 6$	$67^{**} \pm 7$	$58 \pm 7$	$63^* \pm 8$	$42 \pm 7$	$48^{**} \pm 11$	$53 \pm 6$	$58^{**} \pm 4$

Plt pre = donor precount. SN/DN = Single/Dual needle. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

## ANNEXE IV

### LA CYTOMETRIE EN FLUX : METHODOLOGIE

Revue de la littérature pour la mesure des marqueurs d'activation par CMF

① **PAS DE FIXATION** : références : (8), (82), (14), (97)

② **Fixation AVANT le contact avec l'anticorps**

Référence	Fixateur	Concentration	Durée	Température	Lavage
(17)	Nakane	NP	une nuit	4°C	Tyrode
(26)	PF	1%	15 min	T° ambiante	PBS/EDTA
(33)	PF	2%	30 min	T° ambiante	PBS/EDTA/BSA
(37)	PF	1%	1 sem. max.	4°C	NP
(46)	PF	1%	20 min	T° ambiante	non
(55)	PF	1%	30 min	T° ambiante	PBS/EDTA
(73)	PF	1%	6h max.	NP	PBS
(77)	PF	2%	1h	4°C	Tyrode
(79)	PF	1%	1h	4°C	Tyrode
(80)	glyoxal + formaldéhyde	0,2% et 0,4%	10 min	T° ambiante	non
(87)	PF	1%	45 min	NP	non
(102)	PF	NP	NP	NP	PBS

NP = non précisé

*Remarques : (33) : nouvelle fixation avec formaldéhyde 1% à 4°C*

*(73) : nouvelle fixation PF 1% pendant 24 heures pour stabiliser la liaison des anticorps avant cytométrie*

③ **Fixation APRES le contact avec l'anticorps**

Référence	Fixateur	Concentration	Durée	Température
(21)	formaldéhyde	1%	NP	NP
(39)	PF	2%	10 min	NP
(48)	PF	1%	jusqu'à analyse	4°C
(53)	formaldéhyde	0,2%	2h max	T° ambiante
(101)	PF	2%	24 h max	4°C

Les fixateurs utilisés sont le glutaraldéhyde, le glyoxal ou le paraformaldéhyde (56).

Le paraformaldéhyde est généralement utilisé à la concentration de 1 %. A plus fortes concentrations, il devient hyper osmolaire (82). Les plus grandes différences observées entre les échantillons fixés et non fixés concernent les concentrations de 1% et 0,5% de formaldéhyde. A plus faible dose (0,2 %), les différences entre les échantillons ne sont pas statistiquement significatives (14).

Il est recommandé de ne pas fixer les échantillons en présence d'anticorps non liés car ceci peut être responsable de liaison non spécifique des anticorps aux plaquettes (82).

D'autres auteurs pensent que la fixation au PF peut avoir lieu indifféremment avant ou après le contact avec l'anticorps (1). La méthode de fixation optimale pour chaque anticorps doit donc être définie dans chaque laboratoire.



Anticoagulant : « Initiales de la solution utilisée ».

Le contenu en plaquettes : « Supérieur ou égal à  $0,5 \times 10^{11}$  dans un volume de 40 à 60 ml de plasma ».

Le nom, la ville et le numéro de téléphone de l'E.T.S. agréé responsable de la préparation.

Le code de l'E.T.S. (\*) (code national approuvé par l'A.F.S.).

Le numéro du don (\*) sans recouvrir le numéro apposé lors du prélèvement (non obligatoire en cas d'étiquetage manuel).

Les groupes sanguins ABO et Rh D (RH I) (\*).

La présence éventuelle d'anticorps immuns anti-A ou anti-B ; dans ce dernier cas, sera ajoutée la mention « Réserver exclusivement à une transfusion isogroupe ABO ».

La mention « Prélevé le..... » (date).

La mention « Utiliser avant le..... à ..... » (date et heure) si conservation sous agitation lente et continue entre +20 °C et +24 °C ou « Transfuser immédiatement ».

La mention « Ne pas exposer au froid ».

#### IV. - Conditions et durée de conservation

Le concentré de plaquettes standard doit être conservé à une température comprise entre +20 °C et +24 °C sous agitation lente et continue.

En cas de préparation avec un dispositif clos ou jugé équivalent sur le plan des garanties, le concentré de plaquettes standard peut être conservé trois ou cinq jours à compter de la fin du prélèvement, selon la qualification de la matière plastique de la poche de conservation. En cas d'ouverture intentionnelle de la poche, lors de la préparation, le concentré de plaquettes standard peut être conservé au maximum six heures.

Si une phase de transport intervient au cours de la conservation, le concentré de plaquettes standard doit être transporté à une température aussi proche que possible de la température de conservation. A l'arrivée, il est recommandé de le remettre sous agitation lente et continue pendant au moins trente minutes avant distribution.

A l'issue de la phase de conservation, une vérification visuelle est effectuée sur chaque unité thérapeutique au moment de la distribution afin d'éliminer les poches présentant des défauts ou dont l'aspect du contenu serait suspect, notamment :

- absence d'aspect moiré lors de l'agitation douce ;
- altération de la couleur ;
- aspect coagulé.

#### Caractéristiques du concentré de plaquettes d'aphérèse (C.P.A.)

##### I. - Dénomination

Concentré de plaquettes d'aphérèse.

##### II. - Définition et description

Le concentré de plaquettes humaines homologue d'aphérèse est une suspension de plaquettes obtenue aseptiquement par aphérèse à l'aide d'un séparateur de cellules à partir du sang veineux d'un donneur, jugé apte médicalement. Il est recueilli dans un récipient autorisé, clos, stérile et apyrogène.

La préparation consiste à prélever du sang veineux chez un donneur, à en retirer des plaquettes et du plasma grâce à un séparateur de cellules et à restituer au donneur les composants sanguins non destinés à l'utilisation thérapeutique. La séparation des plaquettes s'opère par centrifugation à flux continu ou discontinu associée ou non à une filtration. Une centrifugation supplémentaire peut être nécessaire afin de réduire la contamination leucocytaire et érythrocytaire ou pour assurer une concentration plaquettaire adéquate.

Sous agitation douce, il se présente en milieu plasmatique comme un liquide moiré sans signe d'hémolyse.

Le volume du concentré de plaquettes humaines homologues d'aphérèse est compris entre 200 et 650 ml en tenant compte du volume de la solution anticoagulante et de conservation. Lorsqu'un autre composant est prélevé simultanément aux plaquettes, le volume total ne doit pas excéder 650 ml.

Le contenu minimal en plaquettes du concentré est de  $2,0 \times 10^{11}$ .

Le pH du produit est compris entre 6,0 et 7,4.

Lorsque le contenu en plaquettes est inférieur à  $2,0 \times 10^{11}$ , le produit peut être utilisé en référence aux caractéristiques du concentré de plaquettes standard (un C.P.S. =  $0,5 \times 10^{11}$  plaquettes au minimum).

Le contenu maximal en leucocytes résiduels du concentré est de  $0,6 \times 10^9$ .

##### III. - Etiquetage

###### 1. Etiquette de fond de poche

a) Destinée à être recouverte par l'étiquette apposée par l'établissement de transfusion sanguine (E.T.S.):

- la mention « Ne pas injecter en l'état » ;
- qualification de la poche en matière plastique pour la conservation des plaquettes : trois jours ou cinq jours ;
- le numéro de lot du récipient en code à barres ;
- la contenance nominale de la poche exprimée en millilitres ;

b) Ne devant pas être recouverte par l'étiquette apposée par l'E.T.S. :

- nom du fabricant du récipient ;
- le numéro de lot du récipient en clair ;
- la mention « Ne pas réutiliser » ;
- la mention « Ne pas utiliser le produit s'il présente des signes visibles d'altération » ;
- la mention « Ne pas utiliser de prise d'air » ;
- la mention « Injecter le produit sanguin par voie intraveineuse au moyen d'un dispositif muni d'un filtre ».

#### 2. Etiquette apposée par l'E.T.S.

La dénomination du produit : « Concentré de plaquettes d'aphérèse ».

Le code du produit (\*) (code national approuvé par l'A.F.S.).

Anticoagulant : « Initiales de la solution utilisée ».

Le contenu en plaquettes exprimé en  $10^{11}$ .

La nature et le volume du milieu de suspension calculé en millilitres.

Le nom, la ville et le numéro de téléphone de l'E.T.S. agréé responsable de la préparation.

Le code de l'E.T.S. (\*) (code national approuvé par l'A.F.S.).

Le numéro du don (\*) sans recouvrir le numéro apposé lors du prélèvement (non obligatoire en cas d'étiquetage manuel).

Les groupes sanguins ABO et Rh D (RH I) (\*).

La présence éventuelle d'anticorps immuns anti-A ou anti-B ; dans ce dernier cas, sera ajoutée la mention « Réserver exclusivement à une transfusion isogroupe ABO ».

S'il y a lieu, noter la présence d'anticorps anti-érythrocytaires irréguliers avec mention de la spécificité en précisant les indications transfusionnelles : « Présence d'anticorps anti-X ». « Réserver à un receveur X négatif ».

La mention « Prélevé le..... » (date).

La mention « Utiliser avant le..... à ..... » (date et heure) si conservation sous agitation lente et continue entre +20 °C et +24 °C ou « Transfuser immédiatement ».

La mention « Ne pas exposer au froid ».

#### IV. - Conditions et durée de conservation

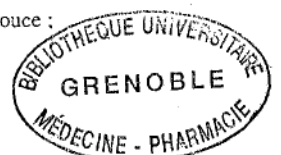
Le concentré de plaquettes d'aphérèse doit être conservé à une température comprise entre +20 °C et +24 °C sous agitation lente et continue.

En cas de préparation avec un dispositif clos ou jugé équivalent sur le plan des garanties, le concentré de plaquettes d'aphérèse peut être conservé trois ou cinq jours à compter de la fin du prélèvement, selon la qualification de la matière plastique de la poche de conservation. En cas de préparation avec un dispositif à montage extemporané, le concentré de plaquettes d'aphérèse peut être conservé au maximum vingt-quatre heures. En cas d'ouverture intentionnelle de la poche, lors de la préparation ou pendant la conservation, le concentré de plaquettes d'aphérèse peut être conservé au maximum six heures.

Si une phase de transport intervient au cours de la conservation, le concentré de plaquettes d'aphérèse doit être maintenu à une température aussi proche que possible de la température de conservation. A l'arrivée, il est recommandé de le remettre sous agitation lente et continue pendant au moins trente minutes avant distribution.

A l'issue de la phase de conservation, une vérification visuelle est effectuée sur chaque unité thérapeutique au moment de la distribution afin d'éliminer les poches présentant des défauts ou dont l'aspect du contenu serait suspect, notamment :

- absence d'aspect moiré lors de l'agitation douce ;
- altération de la couleur ;
- aspect coagulé.



(\*) Ces items doivent figurer en clair et en code à barres dans le même sens de lecture.



# Serment

des

# Apothicairees

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Christelle CORNE

**Titre de la thèse**

Etude de la qualité des concentrés plaquettaires d'aphérèse (CPA)  
dans le cadre de la validation  
d'un nouveau processus de séparation COBE Spectra Turbo.

**Résumé**

Le concentré plaquettaire d'aphérèse est préparé par l'extraction sélective de plaquettes, *ex vivo*, grâce à un séparateur de cellules qui restitue au donneur ses autres composants sanguins puis il est conservé à température ambiante pendant 5 jours maximum. Le séparateur COBE Spectra 5.1 a été amélioré afin de permettre une meilleure extraction des plaquettes ; la nouvelle version est appelée Turbo.

Le but de cette étude était de comparer selon des critères analytiques *in vitro* la qualité des deux types de CPA. Trente donneurs volontaires en thrombaphérèse ont été prélevés deux fois à 8 semaines d'intervalle : une fois sur la version 5.1 et une autre fois sur la version Turbo. Les paramètres suivants ont été mesurés à J0, J3 et J5 sur la suspension plaquettaire : indice de tournoiement, pH, leucocytes résiduels, VPM, CD62P membranaire, LDH, glucose,  $\beta$ TG et GMP140. Nous avons étudié 60 CPA qui sont tous conformes à la norme AFS (pH, volume, nombre de plaquettes, nombre de leucocytes résiduels). L'ensemble des paramètres mesurés est similaire pour les deux versions à l'exception du VPM (supérieur pour les plaquettes issues de la version Turbo).

Nous avons observé sur la totalité des poches, conformément aux résultats de la littérature, une légère acidification du milieu, une consommation de glucose et une lyse plaquettaire très modérée. La modification majeure à l'origine de la "storage lesion" est l'activation plaquettaire progressive de J0 à J5 responsable d'une part de la dégranulation alpha (29 % à 57 % de plaquettes CD62P<sup>+</sup> en moyenne et relargage de deux facteurs solubles  $\beta$ TG et GMP140) et d'autre part du flip-flop membranaire (exposition de la phosphatidylsérine à l'extérieur de la membrane).

L'intérêt de ce travail est de servir de base pour définir ultérieurement les critères majeurs d'altération des fonctions plaquettaires et leurs valeurs seuil dans le cadre du contrôle qualité prétransfusionnel.

**Mots clés**

Plaquette, Concentré plaquettaire d'aphérèse, Activation plaquettaire, Fixation au paraformaldéhyde, P-sélectine, Annexine-V, Cytométrie de flux,  $\beta$ -thromboglobuline.

**Composition du jury**

Président : Monsieur le Professeur A. FAVIER  
Membres : Monsieur le Professeur J.C. BENS  
Madame le Professeur E. DAUBROSSE  
Madame le Docteur M.C. JACOB  
Monsieur le Docteur P. DRILLAT

**Adresse personnelle de l'auteur**

[Données à caractère personnel]