



HAL
open science

Influence de la conservation du culot globulaire canin sur la composition électrolytique du produit transfusé

Ariane Willame

► **To cite this version:**

Ariane Willame. Influence de la conservation du culot globulaire canin sur la composition électrolytique du produit transfusé. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03630119

HAL Id: dumas-03630119

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03630119v1>

Submitted on 23 Feb 2023

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.

Année 2022

**INFLUENCE DE LA CONSERVATION DU CULOT
GLOBULAIRE CANIN SUR LA COMPOSITION
ÉLECTROLYTIQUE DU PRODUIT TRANSFUSÉ**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

le 10 mars 2022

par

Ariane, Nadine, Hélène WILLAME

sous la direction de

Patrick VERWAERDE

JURY

Président du jury :	M. Sylvain BELLIER	Professeur à l'EnvA
Directeur de thèse :	M. Patrick VERWAERDE	Professeur à l'EnvA
Examineur :	M. Pierre DESHUIILLERS	Maître de Conférences à l'EnvA
Membre invité :	Mme Alix BARBARINO	Praticien Hospitalier Adjointe à l'EnvA

Liste des personnes intervenant dans l'enseignement



Directeur : Pr Christophe Degueurce
Directeur des formations : Pr Henry Chateau
Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Professeurs émérites : Pr Pascal Fayolle, Pr Bernard Paragon
Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Moraillon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Élevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - **Adjoint :** Pr Blot Stéphane

<p>Discipline : anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Verwaerde Patrick <p>Discipline : cardiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier contractuel <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Pignon Charly, Ingénieur de recherche - Praticien hospitalier - Dr Volait Laetitia, Praticienne hospitalier contractuelle <p>Discipline : dermatologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cochet-Faivre Noëlle, Praticienne hospitalier contractuelle <p>Discipline : ophtalmologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de clinique équine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Lélia, Maître de conférences - Dr Coudry Virginie, Praticienne hospitalier contractuelle - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Ingénieure de recherche - Praticienne hospitalier - Dr Mespoulhès-Rivière Céline, Ingénieure de recherche-Praticienne hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tallaj Amélie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Tanquerel Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel 	<p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Benchkroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guibert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Legros Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Maurey-Guéneq Christelle, Maître de conférences - Dr Mortier Jérémy, Maître de conférences associé <p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Fontbonne Alain - Pr Grandjean Dominique* - Dr Maenhoudt Cindy, Praticienne hospitalier contractuelle - Dr Nudemann Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticienne hospitalier contractuelle <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Decambon Adeline, Maître de conférences - Pr Manassero Mathieu - Dr Maurice Emeline, Assistante d'Enseignement et de Recherche Contractuelle - Pr Viateau-Duval Véronique*
--	---

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - **Adjoint :** Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Bolnot François, Maître de conférences* - Pr Cartier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mtimet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle <p>Unité pédagogique de maladies réglementées, zoonoses et épidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Dr Guétin Poirier Valentine, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier contractuel - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de reproduction animale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Maufré Vincent, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences* - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Pr Ponter Andrew <p>Rattachée DPASP</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Wolgust Valérie, Praticienne hospitalier contractuelle
--	---

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - **Adjoint :** Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline* <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Jouvion Grégory, Professeur associé - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Épidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Maignac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée 	<p>Unité de parasitologie, mycologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Pr Guillot Jacques - Dr Polack Bruno, Maître de conférences* - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticienne hospitalier contractuelle <p>Rattachée DSBP</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Dalaine Stéphanie, Professeur agrégée (Sciences de la Vie et de la Terre)
---	---

* responsable d'unité pédagogique

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, Professeur à l'EnvA

Qui nous a fait l'honneur de présider notre Jury,

Hommage respectueux.

A M. Patrick Verwaerde, Professeur à l'EnvA,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la direction de ma thèse,

Pour son aide apportée à la réalisation de ce travail,

Sincères remerciements.

A Mme Alix Barbarino, Maitre de conférences à l'EnvA,

Qui a été mon professeur référant durant toute l'expérimentation,

Pour son soutien et son aide face aux difficultés rencontrées,

Sincères remerciements.

A M. Pierre Deshuillers, Professeur à l'EnvA,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ma thèse,

Sincères remerciements.

Au service ARUSI du ChuvA,

Pour son aide apporté dans la réalisation des expérimentations, pour leur disponibilité et leur bienveillance tout au long de ce travail,

Sincères remerciements.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	4
Liste des abréviations.....	5
Introduction.....	7
Première partie : bibliographie.....	9
1. Les différents conservateurs des dérivés sanguins.....	9
A. <i>Propriété d'un conservateur de dérivés sanguins</i>	9
B. <i>Conservateurs des dérivés sanguins en médecine vétérinaire</i>	9
a. La solution CPD.....	9
b. La solution CPDA.....	10
c. Utilisation de solutions additives.....	10
C. <i>Le stockage à basse température</i>	11
2. Conséquences du vieillissement sur les paramètres sanguins.....	11
A. <i>Hémolyse et lésions de stockage</i>	11
a. L'hémolyse sanguine.....	11
b. Lésions de stockage.....	12
B. <i>Conséquence de la durée de stockage sur les paramètres plasmatiques</i>	14
3. Conséquences pour le patient transfusé.....	17
A. <i>État des données en médecine transfusionnelle humaine</i>	17
B. <i>Apport des études conduites chez l'animal</i>	17
Deuxième partie : étude expérimentale.....	19
1. Introduction et objectifs de l'étude.....	19
2. Matériels et méthodes.....	19
A. <i>Choix de l'effectif</i>	20
a. Age et taille des animaux.....	20
b. Examens de santé pré don.....	20
c. Examens complémentaires réalisés au moment du don.....	20
B. <i>Prélèvement sanguin et élaboration du culot globulaire</i>	21
a. Matériel nécessaire au don.....	21
b. Protocole de prélèvement i.e. procédure de don de sang.....	21
c. Protocole de séparation et de préparation d'un culot globulaire.....	22
C. <i>Déroulement de l'étude, prélèvement et analyses au cours du temps</i>	22
a. Méthode de prélèvement des échantillons.....	22
b. Analyses réalisées sur les échantillons prélevés de façon itérative.....	23
D. <i>Analyses statistiques</i>	24
3. Résultats de l'étude.....	24
A. <i>pH, ionogramme, lactates et pressions partielles en O₂ et CO₂</i>	24
B. <i>Biochimie générale des culots globulaires au cours du stockage</i>	27
C. <i>Résultats de la numération formule sanguine des culots globulaires</i>	29
4. Discussion des résultats de l'étude.....	30
A. <i>Influences du métabolisme érythrocytaire</i>	30
B. <i>Modifications électrolytiques/ioniques</i>	31
C. <i>Modifications biochimiques</i>	32
D. <i>Modifications hématologiques</i>	32
E. <i>Limites de notre étude</i>	33
Conclusion.....	35
Liste des références bibliographiques.....	37

Liste des figures

Figure 1 : Changements principaux suite au vieillissement des globules rouges dans une banque de sang (d'après D'Alessandro <i>et al.</i> , 2015).....	13
Figure 2 : Courbes de survie de Kaplan Meier de chiens ayant été transfusés, dans un contexte de pneumonie à staphylocoques dorés, avec du sang conservé 7 ou 42 jours et lésions pulmonaires associées (d'après Solomon <i>et al.</i> , 2013).....	18
Figure 3 : Embout de prélèvement des poches de culot globulaire.....	23
Annexe 1 : Avis ComERC n°2021-11-26.....	42

Liste des tableaux

Tableau 1 : Durée de conservation du sang en fonction de l'anticoagulant utilisé (d'après Chabanne et al., 1994, Haldzne S. et al., 2004 Thébault A. 2005).....	10
Tableau 2 : Principales modifications des paramètres sanguins au cours du stockage dans une banque de sang (d'après Verma et Dahiya, 2015).....	15
Tableau 3 : Résultats : Évolution du pH au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid	24
Tableau 4 : Résultats : Évolution des concentrations (moyenne(écartype)) en ions monovalents et lactates au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid	25
Tableau 5 : Résultats : Évolution des concentrations en Ammoniac et Glucose au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid	25
Tableau 6 : Résultats : Évolution des pressions partielles en oxygène et en CO2 au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid	26
Tableau 7 : Résultats : Évolution des paramètres hématologiques (moyenne(écartype)) au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid.....	27

Liste des abréviations

CPDA : Solution de Citrate Phosphate Dextrose Adénine

VGM : Volume Globulaire Moyen

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

PAL : Phosphatases Alcalines

ALAT : Alanine Transaminase

2,3-DPG : 2,3 diphosphoglycérate

GSH : Gluthathion

PPP : Voie des pentoses phosphates

NADPH : Complexe enzymatique membranaire appartenant aux oxydoréductases.

AE1 : Anion Exchanger 1, co-transporteur anionique qui régule l'échange chlore/bicarbonate

4.1 : Transporteur Band 4.1

4.2 : Transporteur Band 4.2

ANK : Ankyrin

CD47 : Protéine CD47

Gluc : Glucose

Lac : Lactate

Hb : Hémoglobine

PKC : Protéine kinase C

PKA : Protéine kinase A

AMPK : Protéine kinase active par l'AMP

ROS : Reactive oxygen species

PS : Phosphatidylserine

PGF2 α : Prostaglandine F2 α

SMases : Sphingomyélinase

SOD1 : Protéine SOD1

PRDX2 : Peroxiredoxin 2

HSPs : Heat shock protein

Band 3 : Protéine Band 3

ATP : Adénosine triphosphate

ADP : Adénosine diphosphate

HPO₄ -- : Ion hydrogénophosphate

H₂O : molécule d'eau

CO₂ : Dioxyde de carbone

PVC + DEHP : Polyvinyl chloride et diéthylhexyl phtalate

CPDA-1 : Solution de conservation citrate dextrose phosphate adénine

DEA 1.1 : Dog erythrocyte antigen 1.1

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

NFS : Numération formule sanguine

ARUSI : Service Anesthésie-Réanimation-Urgences-Soins Intensifs

ChuvA : Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort

TRC : Temps de recoloration capillaire

ACVIM : American College of Veterinary Medicine

Introduction

La transfusion sanguine peut être définie comme l'administration intraveineuse de sang ou de dérivés sanguins. Cet acte thérapeutique très fréquent en médecine humaine présente de nombreuses indications. Il peut ainsi permettre de rétablir la volémie ainsi que le transport d'oxygène mais aussi d'apporter des protéines et des facteurs plasmatiques de coagulation au patient.

Cet acte est aujourd'hui beaucoup moins développé en médecine vétérinaire, d'une part à cause de son coût, mais aussi à cause de la difficulté à s'approvisionner et à conserver les produits sanguins pour une clinique. Il n'existe en effet à l'heure actuelle aucune structure permettant d'approvisionner les cliniques vétérinaires en produits sanguins, en France.

Cependant, les indications vétérinaires de la transfusion sont les mêmes qu'en médecine humaine et de plus en plus de grands centres hospitaliers développent aujourd'hui leurs propres banques de sang. Sachant que la plupart des connaissances autour du stockage des produits sanguins sont issus de la médecine humaine, il apparaît donc utile de s'intéresser à ce sujet en médecine vétérinaire.

La principale question soulevée par les études concerne aujourd'hui le temps de stockage de ces produits sanguins. Cependant, il est établi que des modifications biochimiques/hématologiques apparaîtraient au sein des poches de sang, avant même la fin de la durée de stockage établie par les recommandations (D'Alessandro *et al.*, 2015). Ces modifications pourraient en outre avoir des conséquences pour les patients transfusés (Koch *et al.*, 2008) (Lelubre *et al.*, 2009).

Nous nous intéresserons ici au culot globulaire, ou concentré érythrocytaire. Ce dérivé sanguin est une suspension d'hématies que l'on sépare du plasma par la centrifugation à froid de sang total. Il a pour principale indication la correction des anémies et présente l'avantage de limiter les volumes transfusés (Chiaramonte D., 2004).

Cette étude prospective descriptive a donc pour objectif principal d'identifier et quantifier les changements biochimiques et plus particulièrement ioniques qui pourraient apparaître au cours du stockage de culot globulaire de chien.

Première partie : bibliographie

1. Les différents conservateurs des dérivés sanguins

Un conservateur de dérivés sanguins est une solution permettant de conserver le sang ou ses dérivés afin qu'ils soient transfusables dans de bonnes conditions, même après un certain temps de stockage. Selon sa composition, il permet la conservation de la viabilité des érythrocytes pendant un certain temps. Le temps de conservation possible dépend donc du conservateur utilisé. C'est pourquoi nous nous intéresserons dans un premier temps à ces conservateurs et à leurs propriétés.

A. Propriété d'un conservateur de dérivés sanguins

La principale propriété d'un conservateur de produits sanguins est de maintenir le sang dans un état liquide, transfusable. Les solutions de conservation doivent donc contenir un anticoagulant.

Leur rôle est aussi de préserver, autant que possible, la viabilité et la fonctionnalité des globules rouges (Feldman *et al.*, 2003). Il faut par exemple que les érythrocytes bénéficient d'un apport de substrat énergétique tout en limitant l'impact potentiel des déchets métaboliques produits.

Tous les anticoagulants ne peuvent donc pas être utilisés pour conserver le sang en vue d'une transfusion. Par exemple, l'héparine, anticoagulant fréquemment utilisé en médecine vétérinaire empêche la formation de thrombine et donc la coagulation plasmatique, mais ne possède aucune propriété conservatrice. En outre, l'héparine peut être contre indiquée lors de la correction thérapeutique de divers troubles de la coagulation. L'héparine est donc très peu utilisable en médecine transfusionnelle.

B. Conservateurs des dérivés sanguins en médecine vétérinaire

a. La solution CPD

En 1893, Wright (Wright, 1893) propose le citrate comme anticoagulant rendant possible la conservation sanguine. Cet anticoagulant se lie en effet au calcium ionisé, empêchant ainsi l'activation de la cascade de la coagulation (Wardrop *et al.*, 1995). Il sera utilisé pour la première fois par Hustin en 1914 lors d'une transfusion directe d'un patient à un autre. Le citrate est encore aujourd'hui l'anticoagulant le plus utilisé en médecine transfusionnelle. Le citrate permet en effet d'empêcher la coagulation du sang prélevé tout en permettant d'effectuer une transfusion directe d'un patient à un autre. Cependant, seul il ne permet pas de préserver la viabilité des globules rouges et apparait donc insuffisant pour permettre le stockage et la conservation des produits sanguins (Rous et Turner, 1916).

Rous et Turner en 1916 proposent d'ajouter au citrate un mélange de glucose et de saccharose comme solution nutritive permettant de préserver la viabilité des érythrocytes. Ces substrats servant à alimenter la voie de la glycolyse permettent alors de conserver les érythrocytes jusqu'à 12 jours. Pour assurer un apport d'énergie aux cellules sanguines prélevées, on utilise aujourd'hui du dextrose, autre substrat servant à la voie de la glycolyse.

La voie de la glycolyse mène cependant à la production de lactate qui acidifie fortement le milieu environnant les cellules conservées. Ce déchet métabolique était limitant pour la conservation des produits sanguins. Afin de pallier à ce problème, du phosphate a par la suite été ajouté au citrate/dextrose pour servir de tampon à ces déchets métaboliques (Wardrop *et al.*, 1995)

On obtient alors la solution CPD (Citrates Phosphate Dextrose), conservateur qui était le plus fréquemment utilisé avant d'être par la suite, encore amélioré. En l'état, ce conservateur permet notamment d'alimenter la voie de la glycolyse et de conserver la viabilité des hématies humaines pendant 28 jours.

Par la suite, de l'adénine a été ajoutée pour obtenir le produit anticoagulant et conservateur de dérivés sanguins le plus fréquemment utilisé en médecine transfusionnelle : le Citrate Phosphate Dextrose Adénine ou CPDA.

b. La solution CPDA

L'adénine ajoutée citrate/dextrose/phosphate permet notamment de maintenir la formation d'ATP en début de stockage, augmentant ainsi la durée de vie des hématies.

Ce conservateur contient de plus une quantité de glucose disponible plus importante que les conservateurs précédents. Ce produit permet donc une conservation plus longue, allant jusqu'à 5 semaines pour des températures comprises entre 1 et 6°C (Griot-Wenk et Giger, 1995) , (Rous et Turner, 1916).

Le tableau suivant, issu de la thèse de doctorat vétérinaire (Chapuis, 2009), récapitule les durées de conservation en fonction des différents anticoagulants utilisés :

Tableau 1 : Durée de conservation du sang et proportion d'anticoagulant à ajouter en fonction de l'anticoagulant

(D'après Chabanne *et al.*, 1994 ; Haldane *et al.*, 2004 ; Thébault, 2005)

Anticoagulant	Durée de conservation du sang à 4°C	Proportion
Héparine	24h Pas de conservation des facteurs de coagulation	500UI/50mL de sang
Citrate de sodium	15j Pas de conservation des facteurs de coagulation	1mL de citrate 10%/15mL de sang
ACD	21j	67,5mL/450mL de sang
CPD	28j	63mL/450mL de sang
CPDA	35j	14mL/100mL de sang

c. Utilisation de solutions additives

Au-delà de ces solutions anticoagulantes et conservatrices, il existe en outre des solutions additives permettant d'augmenter la durée de stockage et, dans le cas de sang total, de maintenir la fluidité du sang pour faciliter son administration. Les additifs doivent être ajoutés de façon stérile dans les 72 heures suivant le don sanguin (D'Alessandro *et al.*, 2019).

Ces solutions additives contiennent du glucose, du phosphate et de l'adénine comme contenus dans le CPDA, auquel sont ajoutés du mannitol, de l'adénine et du bicarbonate. Comme souligné par divers textbooks de référence consacrés à la médecine transfusionnelle vétérinaire, ces additifs augmenteraient la durée de vie des hématies (Carolyn A. Sink, 2017).

Si ces solutions additives sont assez largement utilisées en médecine humaine, elles demeurent sous-utilisées en médecine vétérinaire. Le conservateur le plus fréquemment utilisé en médecine transfusionnelle vétérinaire reste donc le CPDA, sans ajout de solutions additives.

C. Le stockage à basse température

Durant la première guerre mondiale, l'année suivant la publication de Rous et Turner (Rous et Turner, 1916), Oswald H. Robertson transfuse pour la première fois avec succès un sang conservé dans une solution Citrate-glucose. Ce sang avait été conservé au frais dans des bouteilles de verre stocké dans de la glace mélangée à de la sciure (Mollison, 2000).

Depuis cette première description, la conservation des produits sanguins se fait à basse température. Le stockage à basse température (ou stockage hypothermique) permet de ralentir les réactions biochimiques, ralentissant ainsi les processus consommant les substrats essentiels à la survie cellulaire (Scott *et al.*, 2005). Ce stockage au froid des dérivés sanguins permet d'allonger leurs temps de conservation en ralentissant la consommation des substrats et la libération de déchets cellulaires au sein du produit sanguin. Lorsque le produit sanguin est conservé avec une solution CPDA, le stockage à basse température permet alors une conservation de 45 jours selon les recommandations de l'ACVIM (Vostal *et al.*, 2018).

Cependant, le stockage à basse température n'est pas sans conséquences pour les érythrocytes. En effet, en ralentissant notamment les transports ioniques les basses températures induisent des modifications des cellules. Ces modifications pourraient à terme avoir des conséquences sur la qualité du produit final transfusé.

2. Conséquences du vieillissement sur les paramètres sanguins

A. Hémolysse et lésions de stockage

a. L'hémolysse sanguine

L'hémolysse est définie comme la rupture des membranes érythrocytaires entraînant la libération dans le plasma (ou sérum) de leurs composants intracellulaires. Dans le cadre de la conservation de produits transfusionnels sanguins, il apparait donc nécessaire de limiter au maximum ce phénomène, afin de pouvoir transfuser le plus longtemps possible des globules rouges qui seront intacts et fonctionnels.

Transfuser un dérivé sanguin présentant une importante hémolysse expose le receveur à des manifestations cliniques de réactions hémolytiques aiguës, pouvant aller jusqu'à impacter son pronostic vital (Buehler et D'Agnillo, 2010). Cette hémolysse peut être visible macroscopiquement après centrifugation du dérivé sanguin. Cependant cette technique reste peu fiable car elle tend à sous-estimer l'hémolysse d'un échantillon (Hawkins, 2002). En pratique, cette approche n'est donc pas suffisamment sensible pour repérer une éventuelle hémolysse du produit sanguin transfusé après conservation.

Afin de limiter les risques d'hémolysse, il est recommandé qu'un protocole précis de prélèvement et de conservation, visant à réduire au maximum les lésions érythrocytaires soit mis en place pour l'ensemble des produits sanguins ayant une composante cellulaire (sang total, culot globulaire) (Vostal *et al.*, 2018).

Il est établi que dès le prélèvement/don de sang, certains facteurs notamment mécaniques peuvent en effet majorer l'hémolysse d'un échantillon. On peut citer notamment un garrot appliqué plus d'une minute, un diamètre insuffisant de l'aiguille utilisée, un débit sanguin trop faible, un manipulateur peu expérimenté... (Heireman *et al.*, 2017). Lorsque l'on réalise un don de sang en vue d'une transfusion, il apparait donc essentiel de considérer ces aspects pratiques visant à limiter les risques d'hémolysse. En général, le respect d'une procédure écrite de prélèvement/don de sang permet de limiter les

risques de variation de ces facteurs mécaniques et permet ainsi d'envisager une constance entre les différentes poches prélevées, ainsi que des dérivés sanguins préparés.

Bien qu'essentielles les conditions et pratiques de prélèvement n'apparaissent pas comme les seuls facteurs responsables d'hémolyse au sein des contenants de dérivés sanguins. Il est en effet établi que lors du stockage même à froid, des modifications biochimiques et hématologiques peuvent se mettre en place au sein de la poche de sang (D'Alessandro *et al.*, 2015). Les érythrocytes accumulent ainsi des microlésions et la biochimie du plasma les environnant est susceptible d'être modifiée. Ces lésions sont appelées lésions de stockage.

b. Lésions de stockage

Dans la plupart des pays, le temps de conservation maximal des poches de sang humain en vue d'une transfusion suivait les recommandations issues de « The US Food and Drug Administration (FDA) ». La FDA recommandait que l'hémolyse initiale soit inférieure à 0.8%, et qu'au moins 75% des érythrocytes transfusés survivent au moins 24h après la transfusion. Cette dernière recommandation a été établie de manière prospective, par traçage radioactif des érythrocytes après leur transfusion chez des patients sains. Ces recommandations menaient alors à conserver les poches de sang pour un maximum de 42 jours (Vostal *et al.*, 2018).

Or, le vieillissement des globules rouges conservés à froid entraîne l'apparition, au cours du temps, de multiples modifications à la fois biochimiques et morphologiques. Elles apparaissent dès le 14^{ème} jour de stockage (D'Alessandro *et al.*, 2015).

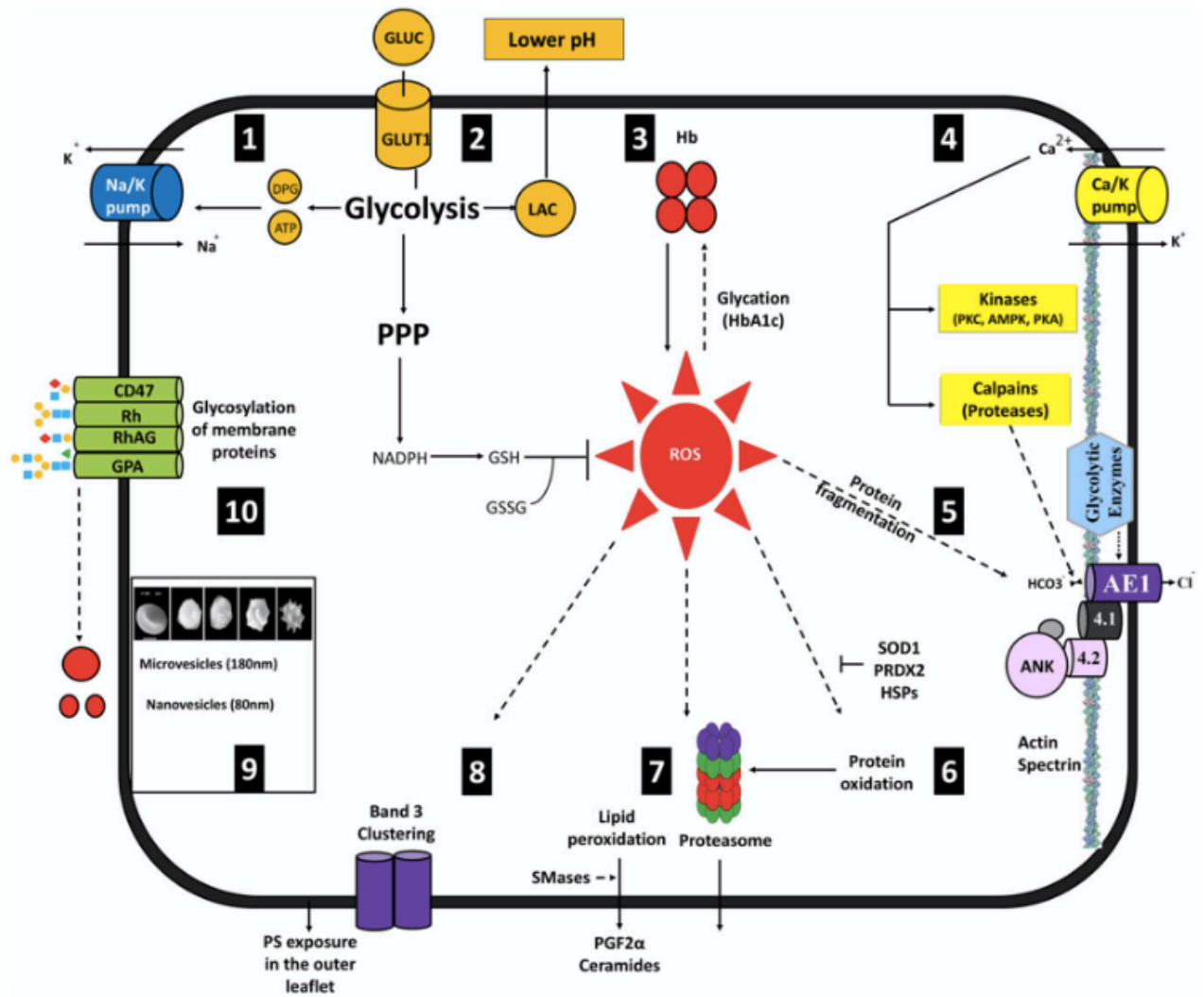
Ces lésions et leurs mécanismes de mise en place ont donc été largement étudiés pour établir si ces modifications sont susceptibles de limiter la durée de conservation des poches de dérivés sanguins et de réduire leur efficacité thérapeutique.

Les modifications biochimiques se mettent en place dès le début du stockage. Elles sont en lien avec l'altération des échanges cationiques à basses températures, et avec la diminution de la concentration en ATP et 2,3-DPG. En effet, pour permettre la production d'ATP, le glucose est métaboliquement utilisé par la voie de la glycolyse (ou voie d'Embden-Meyerhoff) qui entraîne la production de lactates. Ces lactates acidifient le milieu et induisent alors un stress oxydatif et à terme diverses modifications protéiques.

En outre, cette voie métabolique ne produit pas de 2,3-DPG. Sa concentration diminue donc rapidement lors du stockage. Or, le 2,3-DPG a pour fonction biologique de diminuer l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Lorsque sa concentration diminue, la capacité des érythrocytes à relarguer l'oxygène diminue. Après une transfusion sanguine, les érythrocytes fonctionnels peuvent néanmoins recommencer à synthétiser du 2,3-DPG. Cependant, la restauration de sa concentration *in vivo* peut prendre jusqu'à 48h, durée pendant laquelle la libération d'oxygène par les érythrocytes transfusés reste altérée (Valeri et Collins, 1971).

Parallèlement d'autres modifications biochimiques complexes sont susceptibles de se mettre en place au sein des poches de dérivés sanguins. Ces altérations sont détaillées dans la figure 1 extraite des travaux d'Alessandro (D'Alessandro *et al.*, 2015).

Figure 1 : Schéma résumant les connaissances actuelles sur les modifications biochimiques survenant lors du vieillissement *in vitro* des érythrocytes conservés sur CPDA (d'après D'Alessandro *et al.*, 2015).



Légende :

1. La basse température et la déplétion en ATP et 2-3-DPG mènent à des modifications de l'homéostasie cationique.
2. Le Glucose est consommé par la glycolyse et produit des lactates, acidifiant le milieu.
3. Le stress oxydatif et la basse température modifient l'homéostasie de la GSH.
4. L'altération de l'homéostasie du calcium entraîne une production d'enzymes protéolytiques.
5. Modulation du pH par une sortie de d'ions chlorure de la cellule, influençant les échanges gazeux et l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (effet Bohr).
6. Oxydation des protéines malgré les mécanismes antioxydants.
7. Modifications de la dégradation des protéines et des lipides.
8. Modifications des protéines et lipides composant la membrane cellulaire.
9. Modification de la déformabilité membranaire, augmentation de la fragilité osmotique, favorisation de l'exocytose de vésicules éliminant les protéines altérées.
10. Les vésicules sont enrichies en hémoglobine, lipides et en portions membranaires.

Conjointement aux modifications biochimiques, les globules rouges présentent des modifications progressives de leur membrane plasmique, entraînant une perte d'élasticité et donc de leur déformabilité. (D'Alessandro *et al.*, 2015). Les mécanismes biochimiques exacts responsables de ces modifications ne sont pas encore parfaitement établis. Si différentes hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène (peroxydation des lipides, oxydation de la spectrine, asymétrie des phospholipides due à la baisse de la concentration en ATP...), tant que le mécanisme initial reste mal connu, il semble difficile d'établir des recommandations précises en matière de stockage et visant à minimiser ces lésions érythrocytaires liées à la conservation des produits sanguins. (Karon *et al.*, 2012)

Depuis ces études sur les lésions de stockage, sachant que les lésions sur les érythrocytes s'accumulent dès le 14^{ème} jour, se pose donc la question de savoir si le sang peut effectivement être conservé 42 jours sans risque pour le patient.

Face à ces données, la conclusion de la FDA en 2016 était de préconiser une approche prudente en réduisant le temps de stockage et/ou d'améliorer les méthodes de conservation. Aucune durée maximale de conservation n'a cependant été recommandée par cet organisme.

B. Conséquence de la durée de stockage sur les paramètres plasmatiques

Les érythrocytes, lorsqu'ils sont stockés, accumulent donc des lésions qui peuvent mener à leur hémolyse spontanée ou même à une réduction de leur durée de vie après transfusion.

Ces lésions ainsi que le contact prolongé plasma/érythrocytes sont en outre susceptibles d'induire des modifications de composition ionique et métabolique du plasma baignant les cellules en cours de conservation.

Les modifications des paramètres sanguins ont été étudiées en médecine humaine, montrant notamment une augmentation des concentrations en potassium, lactate, LDH, ammoniac et hémoglobine associée à une baisse de la concentration plasmatique en bicarbonate et en glucose (Latham *et al.*, 1982), (Bailey *et al.*, 1975).

Le tableau 2 ci-dessous illustre l'évolution des différents paramètres sanguins à J0, 3, 7, 14, et 21 de stockage de sang humain dans des poches CPDA-1 issu de l'étude (Verma et Dahiya, 2015).

Tableau 2 : Principales modifications des paramètres plasmatiques au cours du stockage de poches de sang humain (d'après Verma et Dahiya, 2015)

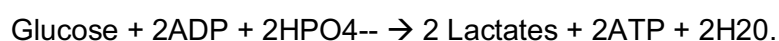
Parameter	Day 0 N=20	Day 3 N=20	Day 7 N=20	Day 14 N=20	Day 21 N=20	pvalue
UREA (mg/dL)	24.7 ± 4.82	23.1 ± 4.87	25.86 ± 5.85	23.3 ± 2.79	23.2 ± 1.3	0.176
CREATININE (mg/dL)	1.06 ± 0.07	1.08 ± 0.08	1.04 ± 0.08	1.03 ± 0.10	1.04 ± 0.10	0.153
URIC ACID (mg/dL)	5.22 ± 0.81	5.39 ± 0.86	5.29 ± 0.93	5.1 ± 1.05	5.1 ± 1.8	0.747
PHOSPHORUS (mg/dL)	11.86 ± 0.62	12.26 ± 0.86	13.4 ± 1.15	15.0 ± 0.76	16.0 ± 0.88	0.000**
AST (mg/dL)	23.15 ± 6.25	24.0 ± 8.61	29.7 ± 9.32	41.1 ± 10.36	45 ± 6.7	0.000**
ALT (mg/dL)	41.45 ± 20.88	41.25 ± 23.7	37 ± 22.4	47 ± 28.36	49 ± 23.55	0.312
PROTEIN (g/dL)	6.14 ± 0.24	6.3 ± 0.24	6.27 ± 0.30	6.41 ± 0.22	6.7 ± 0.77	0.003*
TRIGLYCERIDES (mg/dL)	175.2 ± 61.63	162.1 ± 57.32	147.26 ± 58.7	154 ± 54.07	152 ± 16.2	0.449
CHOLESTEROL (mg/dL)	147.15 ± 25.47	141.4 ± 24.72	141.8 ± 23	137.3 ± 23.2	135 ± 14.7	0.599
HDL-C (mg/dL)	31.6 ± 6.69	29.85 ± 6.58	29.6 ± 6.59	37.2 ± 28.8	35 ± 20.8	0.122
LDL-C (mg/dL)	80.55 ± 21.2	77.65 ± 15.52	82.7 ± 17.4	78.6 ± 14.6	79.2 ± 15.0	0.398
VLDL-C (mg/dL)	35.00 ± 12.21	32.55 ± 11.47	29.5 ± 11.7	31.5 ± 10.78	29.5 ± 12.2	0.505
LDH (mg/dL)	205.15 ± 32.7	293.0 ± 51.61	516.7 ± 153.7	699.4 ± 78.6	750 ± 23.2	0.000**
Ph	7.03 ± .035	6.97 ± 0.04	6.86 ± 0.07	6.84 ± 0.15	6.75 ± 0.04	0.000**
Calcium (mg/dL)	0.04 ± 0.005	0.045 ± 0.006	0.048 ± 0.04	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.008	0.011*
Chloride (mg/dL)	87.75 ± 2.55	92.20 ± 2.41	97.4 ± 6.62	94.4 ± 2.45	85.9 ± 3.30	0.000**
Sodium (mEq/L)	158.8 ± 2.03	153.2 ± 2.84	146.7 ± 6.07	140.2 ± 4.66	144.75 ± 4.94	0.000**
Potassium (mEq/L)	3.26 ± 0.25	6.78 ± 0.82	10.1 ± 1.28	16.56 ± 2.19	20.3 ± 3.62	0.000**
HCO3 (mg/dL)	17.6 ± 1.24	16.78 ± 1.98	13.09 ± 2.76	6.25 ± 3.41	4.79 ± 1.34	0.000**

*Significant difference from 0 day according to Dunnet test in each row.
**Highly significant difference from 0 day according to Dunnet test in each row.

L'augmentation de la concentration en potassium au cours du temps résulte en partie à l'hémolyse survenant au sein de la poche. Chez l'homme, il est établi que les érythrocytes lysés libèrent massivement le potassium qu'ils contenaient. De plus, comme évoqué plus haut les pompes à cations, et notamment la pompe Na/K sont inhibées dans les conditions de conservation au froid. En conditions physiologiques, cette pompe transmembranaire fait sortir 3 ions sodium et rentrer 2 ions potassium en intracellulaire. Lorsqu'elle est inhibée, il y existe moins de potassium entrant dans la cellule par rapport à la quantité sortante. Le milieu extracellulaire s'enrichit donc en potassium.

Pour des raisons similaires, le sodium suit une modification inverse et diminue en concentration dans le milieu extracellulaire. Cette diminution est décrite par Verma et al. (Verma *et al.*, 2015), mais reste inconstante car certaines études comme celle de Jeremiah et al. (Jeremiah et Moore-Igwe, 2012) n'ont pas mis en évidence de changement significatif de la natrémie.

En l'absence d'oxygène et d'ATP, la voie métabolique majoritaire des érythrocytes est la glycolyse. Cette voie anaérobie suit l'équation suivante :



Cette voie métabolique conduit donc à la production d'acide lactique et à une diminution du pH. Or, il est établi que la concentration extracellulaire en potassium augmente lors d'acidémie. Ce mécanisme contribue sans doute aussi à l'augmentation de la kaliémie au cours du stockage de produits sanguins.

Cette majoration de la kaliémie peut en outre s'avérer dangereuse pour les patients transfusés et notamment pour ceux souffrant d'une affection cardiaque ou rénale. Dans l'optique de la prévention de ces risques, il existe des filtres adsorbant le potassium.

L'acidose métabolique, qui se met en place au sein de la poche de sang, modifie également la concentration en calcium ionisé. Dans le cas de conservation de sang sur une poche CPDA-1, la concentration en calcium est toujours très basse. Le citrate chélate les ions calcium et empêche ainsi la coagulation. Cependant, une acidose métabolique diminue l'affinité du calcium pour les protéines entraînant ainsi une augmentation du calcium ionisé au cours du temps qui reste cependant dans les limites de la norme.

A l'inverse, la concentration en bicarbonate diminue avec la durée du stockage. Cette diminution peut être attribuée à l'acidose qui se met en place et qui induit la formation de CO₂ à partir des bicarbonates (conforme à l'équation d'Anderson-Hasselback). Les poches (PVC+DEHP) utilisées pour le stockage des dérivés sanguins n'étant pas imperméables au CO₂ gazeux, celui-ci peut s'échapper de la poche donc la pression partielle en CO₂ n'augmente pas durant le stockage.

Finalement, la concentration en phosphates varie aussi au cours du temps de stockage des poches de sang. L'augmentation observée s'explique par le fait que le sang total contient des phosphatases qui hydrolysent les esters phosphatés, augmentant ainsi la quantité de phosphate inorganique dans le sang stocké. De plus, si le sang est conservé sur CPDA-1, cet anticoagulant contient lui aussi des phosphates. On observe ainsi des valeurs de concentration en phosphates élevées tout au long du stockage.

En ce qui concerne la médecine vétérinaire, des études similaires ont été menées sur des culots globulaires de chien. Ces études sont peu nombreuses et prennent en compte moins de paramètres que leurs équivalents en médecine transfusionnelle humaine. Cependant pour les paramètres étudiés (lactates, glucose, potassium, chlore, urée, gaz du sang, pH et pourcentage d'hémolyse) les variations observées apparaissent similaires à celles constatées en humaine (Wilson *et al.*, 2017) (Rodrigues *et al.*, 2020).

Ces premières données plus spécifiquement vétérinaires semblent néanmoins indiquer que la kaliémie augmente moins qu'en humaine, notamment lors des deux premières semaines de stockage (Wilson *et al.*, 2017). Cette différence observée peut s'expliquer par le fait que les érythrocytes canins contiennent moins de potassium que les érythrocytes humains (Castranova *et al.*, 1979).

Les paramètres sanguins apparaissent donc comme variant de façon importante au cours du stockage de dérivés sanguins figurés dans une banque de sang. En outre, ces modifications apparaissent bien avant la date limite de conservation habituellement fixée par les principales recommandations. Ces constats encouragent donc à une stricte prudence quant à la durée de conservation du sang mais aussi à mettre en place une surveillance de ces variations et d'étudier leurs conséquences potentielles sur l'animal receveur transfusé avec de tels produits.

3. Conséquences pour le patient transfusé

A. État des données en médecine transfusionnelle humaine

Comme indiqué précédemment, au fur et à mesure de la conservation des modifications s'observent dans les poches de dérivés sanguins figurés conservés à froid. Ces dernières peuvent en outre altérer la qualité du sang transfusé et donc altérer le bénéfice attendu. Il n'existe cependant pas d'étude prospective réalisée en médecine humaine permettant de déterminer de façon certaine si la transfusion de globules rouges vieilliss est un danger pour le patient.

Les études sur le sujet sont majoritairement des études rétrospectives :

Lors d'une étude réalisée sur 31,497 patients entre avril 2012 et octobre 2015, la mortalité n'était statistiquement pas différente entre le groupe de patient ayant reçu un sang stocké peu de temps (13 jours en moyenne) et le groupe ayant reçu du sang plus ancien (23,6 jours en moyenne) (Heddle *et al.*, 2016). Cette étude de grand effectif semble indiquer qu'il n'existe pas de risque à transfuser un sang conservé longtemps.

Cependant, d'autres études tendent à montrer que la transfusion de sang conservé plus de deux semaines entraîne des conséquences morbides chez certaines catégories de patients. Les catégories identifiées comme étant à risque selon ces études seraient notamment les patients admis pour des traumatismes, et les patients en états critiques (Koch *et al.*, 2008),(Lelubre *et al.*, 2009).

Bien que les études soient en partie contradictoires, il semble qu'il y ait donc peu de risques à transfuser un sang conservé longtemps pour la majorité des patients, hors certaines situations pathologiques particulières. En médecine humaine, il n'existe pas de consensus clair conduisant à la nécessité de réduire ou non la durée de stockage du sang.

B. Apport des études conduites chez l'animal

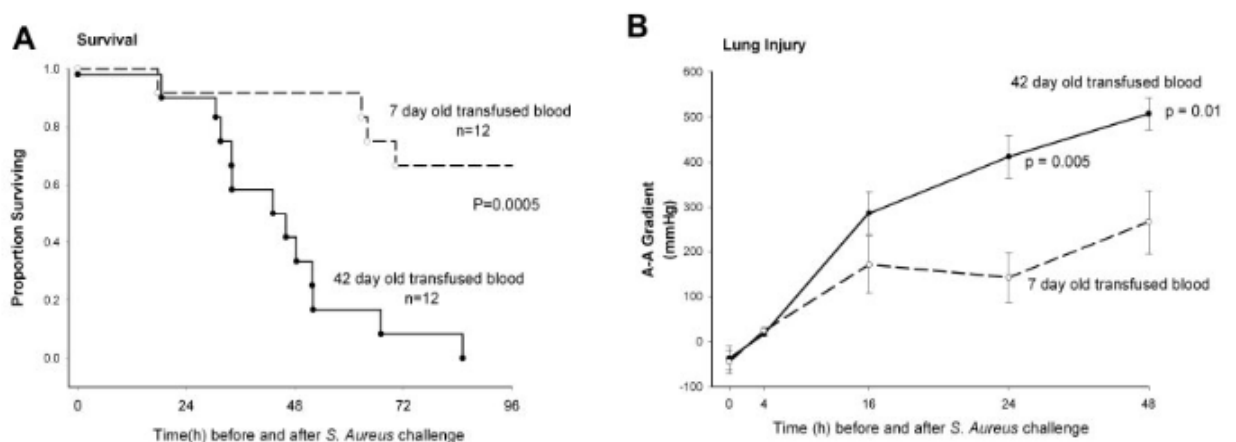
Afin de répondre à la problématique du risque transfusionnel associé à l'administration de dérivés sanguins conservés plus de 14 jours, des études ont été menées sur des modèles animaux.

Ainsi, il a été établi l'impact potentiellement morbide d'une transfusion de sang hémolysé. A la suite de transfusion de sang hémolysé, il a été rapporté des signes cliniques équivalents à ceux d'une réaction hémolytique aigue (pétéchies, méléna, hématurie, fièvre, et dyspnée lors d'infiltration pulmonaire inflammatoire). Les analyses ont en outre montré une augmentation des temps de coagulation, une hémoglobinurie, une hémoglobinémie et une thrombocytopenie (Patterson *et al.*, 2011). Cette hyperhémoglobinémie libre induit des effets oxydatifs et vasoactifs qui peuvent être délétères chez le patient transfusé, menant notamment à des dysfonctions vasculaires et des lésions rénales (Buehler et D'Agnillo, 2010).

D'autres études ont directement comparé les conséquences d'une transfusion d'un sang conservé longtemps par rapport à une transfusion de sang plus récent. Ces études animales montrent une augmentation importante de la mortalité lorsqu'on transfuse de façon massive un sang conservé 42 jours (Solomon *et al.*, 2013).

Dans une étude expérimentale conduite sur des chiens ayant une pneumonie à staphylocoques dorés des lésions due à une conservation longue ont été mises en évidence. Cette étude tend à montrer qu'un sang conservé pendant 42 jours a tendance à s'hémolyser *in vivo*, relarguant dans le milieu extracellulaire de l'hémoglobine à l'origine d'une vasoconstriction. Des dommages ischémiques sur les poumons et une diminution des échanges gazeux ont été aussi mis en évidence et expliquent la mortalité plus importante observée dans ce groupe d'animaux (Solomon *et al.*, 2013).

Figure 2 : Courbes de survie de Kaplan Meier de chiens ayant été transfusés, dans un contexte de pneumonie à staphylocoques dorés, avec du sang conservé 7 ou 42 jours (A) et les lésions pulmonaires associées (B) (d'après Solomon *et al.*, 2013)



Ces différentes observations faites chez le chien et confirmées par l'étude de Hann *et al.* (Hann *et al.*, 2014) expliquent qu'en médecine vétérinaire, il est actuellement recommandé de ne pas transfuser un sang de plus de 7 jours chez un chien présentant notamment une anémie hémolytique à médiation immunitaire. Bien que cette recommandation soit largement admise pour les animaux en anémie hémolytique à médiation immunitaire, force est de constater que les études bien conduites restent peu nombreuses pour répondre à cette question dans d'autres contextes pathologiques.

S'il semble que les risques iatrogènes augmentent avec la durée de conservation des dérivés sanguins, il reste encore de nombreuses interrogations autour des modifications notamment biochimiques induites par la conservation et le stockage à froid de dérivés sanguins figurés chez le chien.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction et objectifs de l'étude

Comme détaillé dans la partie bibliographique, des changements s'opèrent au sein des produits sanguins pendant leur conservation. Ces changements apparaissent bien avant la date limite de conservation préconisée aujourd'hui et pourraient avoir des conséquences morbides iatrogènes pour certaines catégories de patients.

Cependant, la majorité des études réalisées à ce sujet ont été menées dans le cadre de la médecine transfusionnelle humaine. Les érythrocytes de chien étant différents des érythrocytes humains, certains des changements observés sur le sang humain pourraient ne pas être de même nature ou de même intensité. L'objectif de ce travail conduit de façon prospective est d'établir les altérations biochimiques et plus particulièrement ioniques en lien avec la conservation de dérivés sanguins figurés de chien.

De plus, cette étude originale porte sur des culots globulaires de chien. Le concentré globulaire (ou culot) est une suspension d'hématies séparé du plasma par centrifugation à froid. Cette opération retire du produit final les facteurs de coagulation et diminue sa pression oncotique. Le concentré globulaire alors obtenu possède généralement un hématoците d'environ 80% (Chiaramonte, 2004). Principale dérivé sanguin transfusé par le service ARUSI du ChuvA, les culots globulaires sont indiqués lors d'anémie et permettent un apport important d'hématies pour une majoration réduite de la volémie.

Ces concentrés ayant été séparés du plasma par centrifugation à froid, les modifications déjà décrites sur le sang total pourraient ne pas être de même nature ou de même intensité lors de la conservation à froid de culot globulaire de chien.

Cette étude s'attache donc à observer et quantifier les modifications ioniques susceptibles de se mettre en place au sein de culots globulaires de chien au cours de leur stockage à froid (4-6°C).

2. Matériels et méthodes

Ce travail de thèse consacré à la conservation des culots globulaires de chien a été conduit dans le cadre de la banque de sang du service d'anesthésie-réanimation-urgence-soins intensifs (ARUSI) du Centre Hospitalier Universitaire d'Alfort (ChuvA).

Nous évaluerons l'évolution de différents paramètres physico-chimiques du liquide extracellulaire de poches de culot globulaire de chien conservées entre 4 et 6°C pour une durée de 42 jours. Ces culots globulaires seront stockés dans les réfrigérateurs de la banque de sang du service ARUSI du ChuvA.

A. Choix de l'effectif

Cette étude a porté sur cinq culots globulaires distincts obtenus sur cinq chiens de plus de 30 kg et de moins de 6 ans de race Golden Retriever. Ce projet a reçu un avis favorable par le Comité d'Éthique en Recherche Clinique (ComERC), cet avis est présenté en annexe 1 : Avis ComERC n°2021-11-26.

a. Age et taille des animaux

Les chiens étaient âgés de 2 à 5 ans. Selon l'étude de Yagi et al. (Yagi et Holowaychuk, 2016), les chiens donneurs doivent être âgés d'au moins 1 an pour avoir des cellules sanguines matures et éviter les effets délétères sur la croissance d'un prélèvement sanguin de plus de 10mL/kg. Les donneurs doivent de plus être âgés de moins de 8 ans. Cette recommandation est en lien avec la probabilité plus élevée qu'un animal de plus de 8 ans soit atteint d'une maladie intercurrente sous-jacente non exprimée cliniquement. Le don pourrait en outre exacerber cette affection, ce qui constituerait une limite éthique au don de sang.

D'après Ferreira et al., 2015, un volume de 11mL/kg peut être prélevé sans risque cardiovasculaire pour un donneur canin en bonne santé. Les poches de culot globulaire utilisées pour cette étude ont une contenance optimale de sang de 350mL (avec un rapport CPDA/sang de 1/7), d'où le poids minimal de 30 kg, retenu pour les animaux donneurs utilisés dans cette étude.

b. Examens de santé pré don

Les chiens retenus pour donner le sang étudié dans ce travail ont été sélectionnés conformément aux bonnes pratiques établies pour la banque de sang du service ARUSI-ChuvA. Ainsi, leur bon état de santé a été vérifié cliniquement conformément aux recommandations de l'American College of Veterinary Medicine ou ACVIM (Wardrop et al., 2005).

c. Examens complémentaires réalisés au moment du don

Au-delà de la détermination du groupage sanguin d'appartenance pour le DEA 1.1, d'après (Wardrop et al., 2005), il convient de rechercher la possible présence d'hétoparasites tels que *Babesia* spp., *Leishmania* spp., *Ehrlichia* spp., *Dirofilaria immitis* et *Anaplasma* spp. Ces agents pathogènes du chien sont en effet susceptibles d'augmenter l'hémolyse au sein d'un culot globulaire : *Babesia* spp parce qu'il est un parasite intra-érythrocytaire, les autres espèces parce qu'elles visent des cellules de la lignée blanche ou plaquettaire pouvant indirectement majorer des phénomènes d'hémolyse au sein des poches de dérivés sanguins figurés. Dans un contexte de transfusion, la recherche de ces hétoparasites permet de plus réduire les risques de transmettre ces pathogènes au patient transfusé.

Dans cette étude, les chiens donneurs étaient des animaux de laboratoire, exempt de ces agents pathogènes. Cette absence de pathogènes a cependant été confirmée par un frottis sanguin et la mise en évidence d'un test rapide 4DX négatif (Idexx) chez chacun des donneurs retenus pour fournir le sang étudié dans ce travail.

B. Prélèvement sanguin et élaboration du culot globulaire

Nous suivrons dans cette étude le protocole habituel de prélèvement au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Alfort (CHUVA) afin de refléter au maximum le culot globulaire habituellement obtenu. Le protocole est donc le suivant :

a. Matériel nécessaire au don

Les matériels nécessaires au don étaient les suivants :

- Poche tripartite de collecte de sang de 350 ml contenant 42 ml de CPDA-1 (Macopharma)
- Compresse avec chlorhexidine et alcool
- Tondeuse
- Balance numérique
- Gants stériles
- 2 Tubes EDTA (pour la NFS et le ionogramme) et 2 tubes héparinés (pour la biochimie) pour les analyses au moment du don
- Compresses sèches pour comprimer la zone après le prélèvement.
- 2 clamps sans dents de souris
- Test rapide DEA 1.1 (Alvedia)

b. Protocole de prélèvement i.e. procédure de don de sang

La procédure de don de sang pratiquée au sein de la banque de sang du service ARUSI-ChuvA a été mise en œuvre comme décrite ci-dessous :

1. Poser un cathéter afin de réaliser une sédation et prélever 10 ml de sang répartis à part égale dans un tube sec et un tube EDTA pour réaliser les analyses sanguines listées ci-dessus.
2. Positionner le chien en décubitus latéral
3. Exposer la jugulaire du chien et tirer doucement les antérieurs vers l'arrière, tondre une zone de 5*5cm dans la région moyenne de la jugulaire.
4. Réaliser une désinfection de la peau avec des gants stériles la zone tondu au moyen de chlorhexidine puis rincer à l'alcool à 90°, répéter l'opération 2 fois successivement.
5. Changer pour une nouvelle paire de gant stériles
6. Poser un clamp hémostatique sur la tubulure de la poche
7. La poche de collecte doit être tenue par l'assistant qui la maintient en dessous du niveau de l'animal.
8. Appliquer une pression sur la portion thoracique de la veine jugulaire de l'animal avec la main non dominante. Attendre de visualiser le gonflement de cette dernière dans la zone tondu. Effectuer une ponction veineuse, biseau vers le haut en essayant au maximum d'avoir une entrée rapide et efficace dans la veine pour éviter la perte de plaquette et la formation de fibrine. Lancer à ce moment le chronomètre
9. Demander à l'assistant de retirer le clamp.
10. Le sang doit couler doucement et aisément dans la poche par gravité.
11. Appliquer un léger balancier à la poche de sang pour mélanger avec l'anticoagulant.

12. Entre temps regarder le poids sur la balance. Une fois que les 350mL de sang sont atteints, relâcher la pression sur la veine.
13. Clamper le tube à environ 5 cm de l'aiguille.
14. Appliquer une légère pression sur le site de ponction à l'aide d'une compresse.
15. Identifier la poche de sang prélevé et indiquer l'heure et la date du prélèvement ainsi que l'identité du donneur
16. Examiner le donneur et évaluer sa fréquence cardiaque, son TRC et son pouls
17. Noter dans un registre toutes les difficultés observées pendant le don : nécessité de replacer l'aiguille, mouvement du donneur, flux sanguin irrégulier, présence de caillot dans le tube.

c. Protocole de séparation et de préparation d'un culot globulaire

La procédure de séparation des dérivés sanguins, afin d'obtenir un culot globulaire, pratiquée au sein de la banque de sang du service ARUSI-ChuvA a été mise en œuvre comme résumé ci-dessous :

- Centrifugation à froid (4°C) de la poche tripartite contenant 350 mL de sang total fraîchement prélevé pendant 5 min à 5000 tours/min dans une centrifugeuse.
- Séparation du plasma surnageant au moyen d'une pince à plasma et orientation du plasma dans la poche du milieu au moyen de l'ouverture du clamp ad hoc
- Transfert du sous-nageant correspondant au culot globulaire vers la 3^e poche contenant l'adénine
- Agitation douce pendant 5 minutes afin d'obtenir une homogénéisation du culot globulaire ainsi isolé.

Après cette séparation, la poche de culot globulaire est sans délai placée au réfrigérateur à une température constante de 4°C vérifiée par un thermomètre enregistreur.

Les poches de culot sont stockées de manière horizontale espacée d'au moins 2 centimètres. Une homogénéisation douce de chaque poche est quotidiennement assurée par l'équipe soignante. L'ensemble de cette procédure est conforme aux recommandations (Högman *et al.*, 1995).

C. Déroulement de l'étude, prélèvement et analyses au cours du temps

Conformément aux objectifs de l'étude, à dates fixes les culots globulaires stockés au froid ont fait l'objet de prélèvements itératifs afin d'assurer les différentes analyses hématologiques et biochimiques.

a. Méthode de prélèvement des échantillons

Le jour du don du sang a été considéré comme J0. Ensuite, les prélèvements au sein des 5 poches de culots globulaires ont été effectués respectivement à J1, J3, J7, J14, J21, J28, J35 et J42. Afin d'assurer ces prélèvements dans les meilleures conditions d'asepsie, ils ont été réalisés au moyen

d'un dispositif spécifique décrit dans la figure 3 et placé sur la poche de culot globulaire au moment de l'initiation de son stockage.

Figure 3 : Embout de prélèvement des poches de culot globulaire :

SPIKE, BAG W/INTEGRATED CLAVE (50/CS)



Avant chaque prélèvement, la poche est agitée doucement pendant 10 secondes. Le bouchon bleu visible sur la photo est retiré et le port de prélèvement est nettoyé à l'aide de chlorhexidine. Un volume de 5ml a été prélevé à l'aide d'une seringue stérile de 5ml.

Ensuite un nouveau bouchon bleu est fixé et protégé par des compresses imbibées avec de la chlorhexidine avant la remise au réfrigérateur de la poche de culot globulaire, jusqu'au temps de prélèvement suivant.

b. Analyses réalisées sur les échantillons prélevés de façon itérative

Le volume de culot globulaire prélevé à chaque temps (J0, J1, J3, J7, J14, J21, J28, J35 et J42) a été réparti comme suit :

- 2ml dans un tube EDTA pour réaliser la numération formule complète (analyseur Procyte, Idexx)
- une goutte est directement placée et étalée sur lame pour réaliser un frottis analysé en microscopie optique après coloration de May-Grünwald Giemsa,
- 2 mL dans un tube héparinate de lithium pour la réalisation des analyses biochimiques (analyseur Catalyst, Idexx) – urémie, créatininémie, glycémie, albuminémie, globulinémie, activités PAL et ALAT, bilirubinémie, protéinémie totale et ammoniémie
- 1 ml est maintenu dans la seringue pour la réalisation immédiate de la réalisation du ionogramme, et les mesures de la lactatémie, du pH, des pressions partielles en O₂ et CO₂ et de la bicarbonatémie (analyseur PrimeVet, Nova Biomedical).

Au jour 42, une culture bactériologique est réalisée au biopôle sur un échantillon de 2mL prélevé dans chaque poche de culot globulaire.

D. Analyses statistiques

Les résultats obtenus à chaque temps de mesure sont présentés sous la forme de moyenne \pm écartype. Après vérification des distributions par le test non paramétrique de Kolmogorov-Smirnov et de l'homogénéité des variances de l'ensemble des variables, pour des raisons d'uniformisation de la présentation des résultats, les comparaisons multiples ont été réalisées par un Kruskal-Wallis bilatéral suivie d'un test post-hoc de Dunn avec la correction de Bonferroni. La valeur observée à J0 a été considérée comme celle du groupe contrôle. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

3. Résultats de l'étude

Les résultats présentés ci-dessous portent sur des concentrés globulaires provenant de cinq chiens mâles de race Golden Retriever d'âges compris entre 3 et 6 ans et pesant entre 31 et 40 kg. Sur les 5 concentrés globulaire, 4 étaient de groupe sanguin DEA1 - et un seul de groupe DEA1 +.

Les cultures bactériologiques effectuées sur les échantillons prélevés à J42 étaient toutes négatives, confirmant l'absence de contamination bactérienne susceptible d'influencer les résultats présentés ci-dessous.

A. pH, ionogramme, lactates et pressions partielles en O2 et CO2

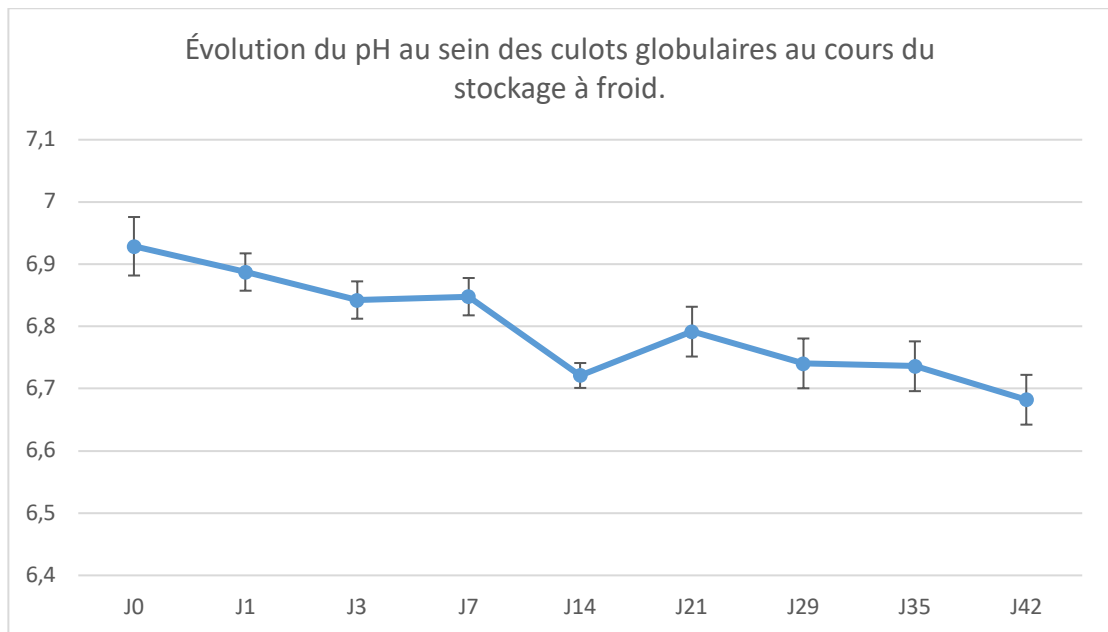
Le tableau 3 récapitule l'évolution de la valeur moyenne du pH observée au sein des culots globulaires de chien au cours de leur stockage à froid, dans les conditions décrites.

Tableau 3 : Évolution du pH (moyenne(écartype)) au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid

	J0	J1	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
pH	6,929 (0,047)	6,887 (0,033)	6,842 (0,027)	6,848 (0,033)	6,721 (0,024)*	6,792 (0,042)*	6,741 (0,041)*	6,736 (0,039)*	6,682 (0,038)*

Remplacement de l'analyseur

* indique une différence significative par rapport à la valeur J0, observée par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-hoc de Dunn avec la correction de Bonferroni pour comparaisons multiples.



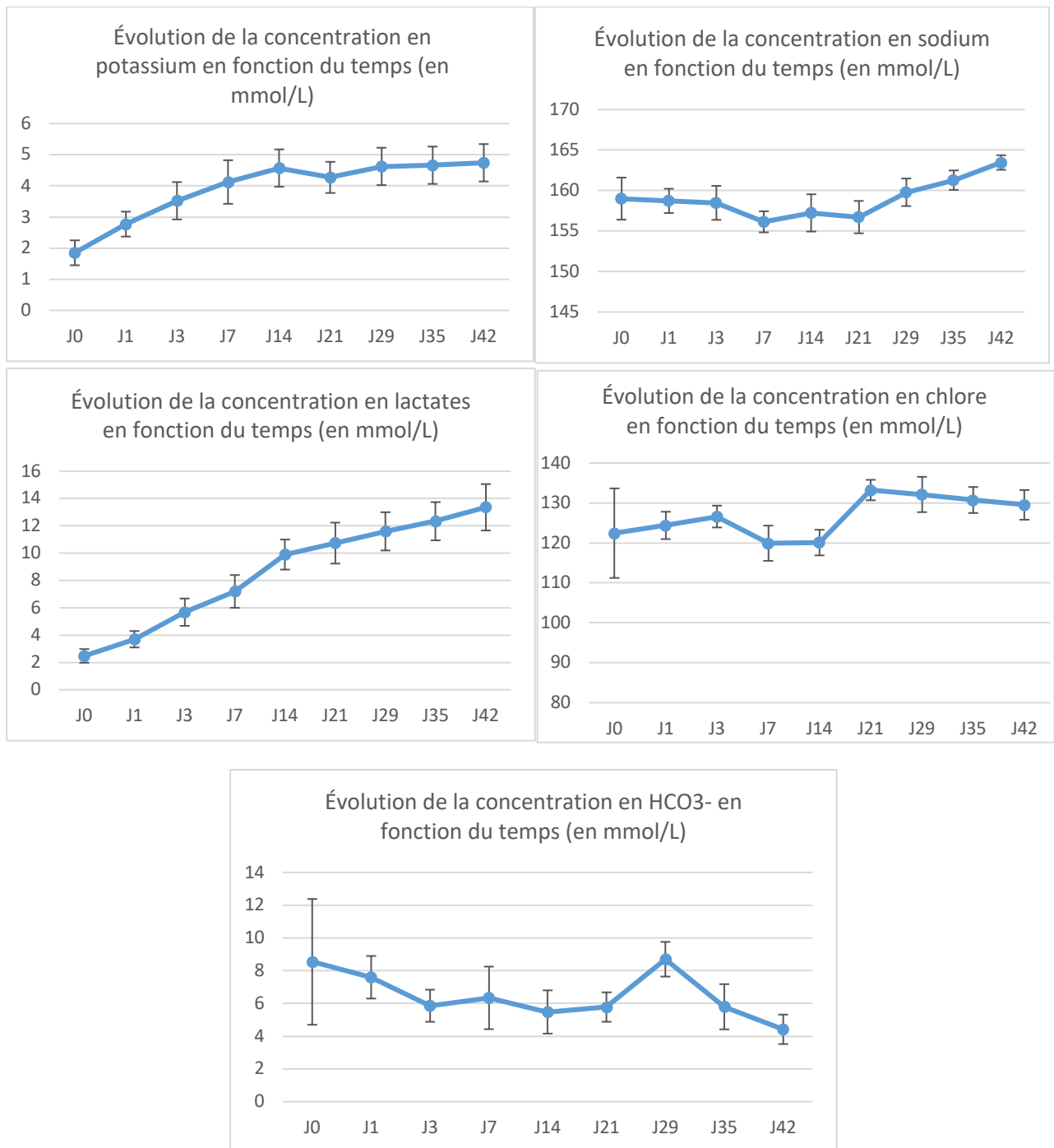
Le pH diminue de façon significative au cours du stockage. De 6,929 +/- 0,047 à J0 à 6,682 +/- 0,038 à J42, la valeur de pH apparait significativement différente à partir de J14.

Ces modifications de pH au sein des culots globulaires s'accompagnent de modifications des concentrations en ions monovalents Na⁺, K⁺, Cl⁻, HCO₃⁻ et lactates telles que présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Évolution des concentrations (moyenne(écartype)) en ions monovalents et lactates au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid

mmol/L	J0	J1	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Na ⁺	159,0 (2,6)	158,7 (1,5)	158,5 (2,1)	156,1 (1,3)	157,2 (2,3)	156,7 (2,0)	159,8 (1,7)	161,3 (1,2)	163,5 (0,9) *
K ⁺	1,9 (0,4)	2,8 (0,4)	3,5 (0,6)	4,1 (0,7) *	4,6 (0,6) *	4,3 (0,5) *	4,6 (0,6) *	4,7 (0,6) *	4,7 (0,6) *
Cl ⁻	122,4 (5,7)	124,4 (1,7)	126,6 (1,4)	119,9 (2,3)	120,1 (1,6)	133,2 (1,3) *	132,1 (1,7) *	130,7 (1,9) *	129,5 (1,9)
Lactates	2,5 (0,5)	3,7 (0,6)	5,7 (1,0)	7,2 (1,2)	9,9 (1,1) *	10,7 (1,5) *	11,6 (1,4) *	12,3 (1,4) *	13,4 (1,7) *
HC03 ⁻	8,5 (2,0)	7,6 (0,7)	5,9 (0,5) *	6,3 (1,0)	5,5 (0,7) *	5,8 (0,5) *	8,7 (0,5)	5,8 (0,7) *	4,4 (0,5) *

* indique une différence significative par rapport à la valeur J0, observée par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-hoc de Dunn avec la correction de Bonferroni pour comparaisons multiples.



La conservation à froid des culots globulaires de chien s'accompagne d'une modification significative tardive de la natrémie alors que nous observons une modification significative de la kaliémie, de la chlorémie, de la lactatémie et de la bicarbonatémie respectivement dès J7, J21, J14 et J3.

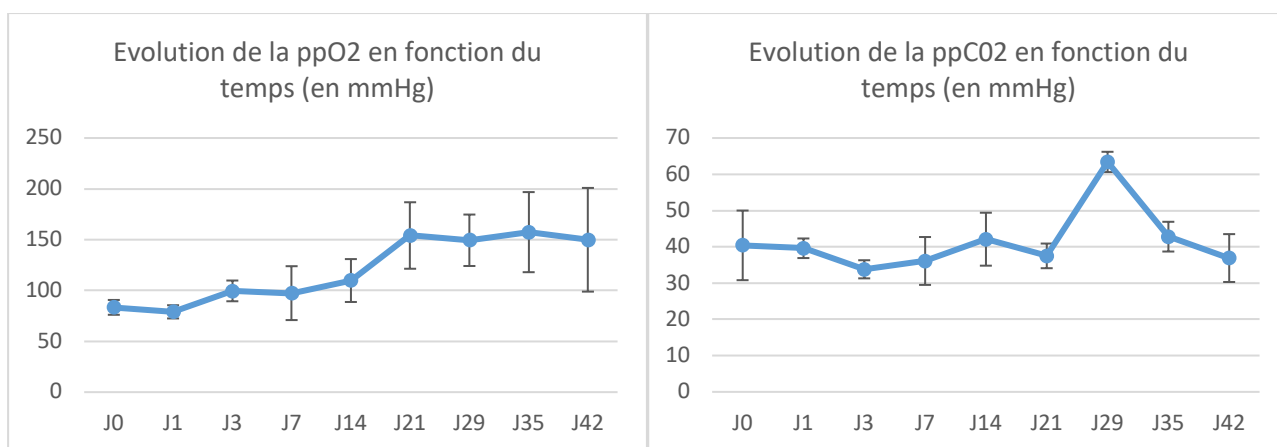
Passant de 2,5 +/- 0,5 à 13,4 +/- 1,7 mmol/L, la lactatémie augmente au cours du stockage à froid. Il est à remarquer que la majoration de la lactatémie s'observe conjointement à la diminution significative du pH au sein du culot globulaire. De même, la kaliémie initialement inférieure aux valeurs usuelles de l'espèce canine, augmente au cours du stockage (de 1,9 +/- 0,4 à 4,7 +/- 0,6 mmol/L, respectivement de J0 à J42) sans toutefois excéder la valeur usuelle haute de l'espèce.

Tableau 5 : Évolution des pressions partielles en O2 et CO2 (moyenne(écartype)) au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid

Remplacement de l'analyseur

	J0	J1	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
PpO2 (mmHg)	83,4 (7,3)	79,0 (6,5)	99,6 (10,2)	97,4 (26,5)	109,8 (21,1)	154,1 (32,7) *	149,4 (25,3) *	157,4 (39,4) *	149,9 (51,0) *
PpCO2 (mmHg)	40,4 (9,6)	39,6 (2,7)	33,8 (2,5)	36,1 (6,6)	42,1 (7,3)	37,5 (3,4)	63,5 (2,8)*	42,8 (4,1)	36,9 (6,6)

* indique une différence significative par rapport à la valeur J0, observée par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-hoc de Dunn avec la correction de Bonferroni pour comparaisons multiples.



Au-delà de la variation transitoire de la pression partielle en CO2 observée à J28, il apparaît que les pressions partielles en oxygène évoluent au cours du stockage à froid. Passant de 83,4 +/- 7,3 à 149,9 +/- 51,0 mmHg entre J0 et J42, on observe une augmentation de l'oxygène dissout dans le liquide extracellulaire des culots globulaires.

B. Biochimie générale des culots globulaires au cours du stockage

L'évolution des différents paramètres biochimiques évalués au cours du stockage à froid des culots globulaires de chien est présentée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Evolution des paramètres biochimiques (moyenne(écartype)) au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid

Paramètres	J0	J1	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Glycémie mmol/L	5,98 (0,30)	6,04 (0,22)	5,88 (0,13)	6,23 (0,17)	6,09 (0,26)	5,58 (0,25)	5,49 (0,32)	5,23 (0,34) *	5,13 (0,27) *
Urémie mg/dL	0,13 (0,04)	0,14 (0,04)	0,13 (0,04)	0,14 (0,04)	0,13 (0,04)	0,07 (0,02) *	0,13 (0,04)	0,13 (0,04)	0,15 (0,04)
Créatininémie mg/dL	2,58 (0,63)	2,77 (0,66)	3,42 (0,53)	3,32 (0,74)	3,74 (1,14)	3,26 (0,87)	3,64 (0,98)	3,78 (1,06)	3,62 (1,00)
Protéïnémie totale g/L	14,50 (0,98)	14,96 (2,18)	15,20 (1,79)	16,00 (2,12)	16,60 (2,51)	16,60 (2,41)	19,00 (2,55)	20,00 (2,65)	22,00 (3,16)
Albuminémie g/L	9,60 (1,95)	8,31 (0,68)	9,60 (0,55)	8,60 (0,55)	9,40 (0,55)	9,40 (0,55)	10,00 (0,71)	10,00 (0,71)	10,80 (0,84) *
Globulinémie g/L	10,20 (10,52)	6,66 (1,74)	5,80 (1,30)	7,60 (1,34)	7,4 (1,67)	6,80 (1,64)	9,40 (1,82)	9,60 (2,19)	11,40 (2,30)
Activité PAL. U/L	5,0 (0,0)	7,1 (4,4)	6,0 (2,2)	5,0 (0,0)	5,0 (0,0)	6,0 (2,2)	5,0 (0,0)	5,0 (0,0)	5,0 (0,0)
Activité ALAT U/L	36,2 (13,4)	34,5 (17,8)	38,2 (19,5)	31,0 (19,0)	25,2 (22,7)	25,4 (20,3)	17,4 (15,1)	9,0 (6,16) *	5,0 (0,00) *
Bilirubinémie totale mg/dL	0,9 (0,0)	1,5 (1,4)	0,9 (0,0)	0,9 (0,0)	2,6 (2,3)	5,4 (2,5) *	6,3 (2,1) *	7,8 (3,0) *	10,7 (3,8) *
Ammoniénémie µmol/L	29,8 (6,6)	59,8 (27,9)	63,6 (43,2)	111,8 (36,1)	170,8 (69,7) *	238,2 (73,8) *	253,4 (84,1) *	285,4 (91,3) *	322,4 (102,8) *

* indique une différence significative par rapport à la valeur J0, observée par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-hoc de Dunn avec la correction de Bonferroni pour comparaisons multiples.

La conservation au froid de culot globulaire de chien est associée à des modifications de nombreux paramètres biochimiques. Si la créatininémie, la protéïnémie totale, la globulinémie et l'activité enzymatique PAL n'apparaissent pas significativement modifiées au cours des 42 jours de stockage, il n'est pas de même de la glycémie, l'urémie, l'albuminémie, l'activité ALAT, la bilirubinémie et l'ammoniénémie qui toutes varient. Si l'ammoniénémie est significativement modifiée au-delà de 14 jours de conservation, les autres modifications s'observent à partir de J21 ou J35.

Macroscopiquement, il n'y a pas de modification de l'aspect, et en particulier de la couleur du plasma au cours du stockage dans cette étude. Cependant, cette analyse visuelle manque de précision et une modification de la couleur du plasma aurait pu impacter certaines valeurs mesurées par le Catalyst Iddex d'après le manuel d'utilisation.

C. Résultats de la numération formule sanguine des culots globulaires

L'évolution des différents paramètres hématologiques évalués au cours du stockage à froid des culots globulaires de chien est présentée dans le tableau 7.

Tableau 7 : Évolution des paramètres hématologiques (moyenne(écartype)) au sein des culots globulaires au cours du stockage à froid

Paramètres	J0	J1	J3	J7	J14	J21	J28	J35	J42
Hématies (/L)	9,2 (1,8)	8,4 (0,6)	8,5 (0,6)	8,6 (0,6)	10,1 (1,5)	9,6 (0,8)	9,8 (0,8)	9,5 (0,9)	8,9 (1,7)
Hématocrite (%)	61,3 (11,5)	55,1 (5,4)	55,3 (4,9)	55,0 (5,3)	64,9 (10,6)	60,5 (6,7)	61,1 (10,7)	60,4 (9,3)	57,9 (13,9)
Hémoglobininémie (g/dL)	21,4 (4,0)	19,3 (1,7)	19,5 (1,5)	19,9 (1,7)	23,3 (3,6)	22,0 (2,1)	22,5 (2,6)	22,1 (2,5)	20,8 (4,3)
VGM (fL)	66,7 (1,7)	65,6 (1,9)	64,9 (1,8)	63,5 (1,8)	64,0 (1,8)	63,0 (2,0)	64,4 (3,1)	64,8 (2,8)	64,5 (3,0)
TCMH (pg)	23,3 (0,3)	23,3 (0,4)	22,9 (0,4)	23,0 (0,4)	23,0 (0,5)	23,0 (0,5)	23,2 (0,6)	23,4 (0,6)	23,0 (0,5)
CCMH (g/dL)	35,0 (0,6)	35,1 (0,5)	35,4 (0,5)	36,2 (0,4) *	35,9 (0,3)	36,4 (0,5) *	35,8 (0,8)	35,7 (0,8)	36,1 (1,1) *
Leucocytes (/L)	12,1 (3,6)	13,1 (3,4)	12,9 (3,4)	13,1 (3,5)	12,7 (5,8)	12,2 (4,5)	12,3 (5,1)	12,0 (4,1)	15,2 (5,3)
Thrombocytes (K/ μ L)	360 (127)	332 (212)	325 (202)	326 (161)	246 (166)	197 (91)	163 (81)	209 (123)	250 (143)

* indique une différence significative par rapport à la valeur J0, observée par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-hoc de Dunn avec la correction de Bonferroni pour comparaisons multiples.

A l'exception, de la CCMH, aucun des paramètres hématologiques étudiés ne semble évoluer de façon significative (test Kruskal-Wallis $p > 0,05$) au cours du stockage à froid de culots globulaires canins.

4. Discussion des résultats de l'étude

L'objectif de cette étude était d'identifier, de quantifier et de mieux comprendre les changements biochimiques et hématologiques s'opérant au sein des culots globulaires de chien au cours de leur stockage à froid.

Peu d'études ont été publiées sur ce sujet en médecine vétérinaire (Wilson *et al.*, 2017), et celles-ci montrent des résultats souvent différents des données issues de la médecine transfusionnelle humaine.

Dans ce travail, nous avons notamment mis en évidence que si les caractéristiques hématologiques i.e. globulaires ne varient pas de façon significative au cours du stockage, les caractéristiques biochimiques du liquide extracellulaire du culot subit diverses modifications telles que principalement :

- une acidification progressive à partir du 14^{ème} jour de stockage
- une hyperlactatémie importante à partir du 14^{ème} jour
- une baisse de la glycémie à partir du 35^{ème} jour
- une majoration de la kaliémie à partir du 7^{ème} jour
- une hyperammoniémie à partir du 14^{ème} jour

Au-delà de la simple observation de ces altérations qui néanmoins s'avèrent très utiles pour mieux comprendre et anticiper de possibles réactions transfusionnelles non immunologiques, il convient de tenter de les mettre en perspectives par rapport aux données de la littérature scientifique consacrée à la médecine transfusionnelle.

A. Influences du métabolisme érythrocytaire

Avec l'acidification progressive du liquide extracellulaire entourant le culot globulaire, nos données confirment celles retrouvées dans la littérature tant vétérinaire qu'humaine (Verma et Dahiya, 2015), (Latham *et al.*, 1982).

Cette diminution résulte au moins en partie du métabolisme érythrocytaire principalement appuyé sur la glycolyse anaérobie. Transformant le glucose en pyruvate puis en acide lactique, la glycolyse anaérobie explique la diminution observée du pH. Cette hypothèse est en outre soutenue par l'observation conjointe de l'augmentation des concentrations en lactates observée au cours du stockage à froid.

Dans la littérature transfusionnelle, l'augmentation des lactates est aussi parfois expliquée par la survenue d'une hémolyse au sein des poches (Wilson *et al.*, 2017). Dans nos conditions, cette hypothèse reste néanmoins peu probable car, l'augmentation de lactatémie observée dans cette étude apparaît linéaire avec le temps. En outre, les données hématologiques recueillies dans ce travail ne supportent pas l'hypothèse d'une hémolyse liée à la conservation. Ainsi, dans notre étude, l'hyperlactatémie observée comme significative à partir du 14^{ème} jour résulte sans doute plus directement du métabolisme érythrocytaire que d'une hémolyse.

Malgré la présence de tampon phosphate dans la solution de conservation CPDA, il existe une acidification significative du milieu dès le 14^{ème} jour de stockage. Cette acidification est en outre susceptible de modifier la structure et la dégradation de certaines protéines, mais aussi les échanges notamment ioniques érythrocytaires. Comme observé dans l'étude d'Alessandro (D'Alessandro *et al.*, 2015), à terme cette acidification est à l'origine d'une modification de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Cette observation est compatible avec nos données de pression partielle en oxygène. Néanmoins, il est aussi possible que la non imperméabilité aux gaz des poches CPDA utilisées dans ce travail puisse constituer une explication de l'augmentation de la pression partielle en oxygène dès le 21^{ème} jour de conservation.

L'acidification issue du métabolisme érythrocytaire explique en outre l'évolution observée de la bicarbonatémie. En effet, les ions bicarbonates jouent un rôle bien connu de tampon plasmatique. Ainsi l'acidification du milieu entraîne le déplacement de l'équilibre d'Henderson-Hasselbalch dans le sens de la formation de CO₂. Nos données montrent une stabilité globale de la pression partielle en CO₂ au sein des culots étudiés. Comme évoqué précédemment, les poches CPDA utilisées dans cette étude ne sont pas imperméables à ce gaz, ainsi il est cohérent d'envisager une diminution de la bicarbonatémie par déplacement de l'équilibre sans pour autant observer un changement de la pression partielle en CO₂ au sein des poches.

B. Modifications électrolytiques/ioniques

Comme évoqué plus haut, différentes études transfusionnelles en humaine témoignent d'une augmentation importante de la kaliémie accompagnée d'une diminution du sodium (Pretti 2010, Obrador *et al.* 2015). Ces études suggèrent que ces modifications puissent être attribuées à la perturbation des échanges membranaires notamment érythrocytaires.

En médecine vétérinaire, l'étude de Wilson (Wilson *et al.*, 2017) a mis en évidence chez le chien des modifications ioniques radicalement inverse à celles observées chez l'homme. Avec une augmentation de la natrémie associée à une évolution biphasique de la kaliémie (augmentation puis diminution), les auteurs de cette étude expliquent ces résultats dissonants par des concentrations intra-érythrocytaires en sodium et potassium très différentes entre le chien et l'homme.

Les modifications de kaliémie observées dans notre étude peuvent être expliquées par des perturbations ioniques en lien avec des lésions de stockage et/ou des échanges ioniques perturbés par le stockage à froid. L'acidification du milieu baignant le culot globulaire peut ainsi, au moins en partie expliquer cette évolution de la kaliémie observée.

Nos données témoignent d'une augmentation progressive et non biphasique de la kaliémie significative dès le 7^{ème} jour de conservation. Cependant, la valeur moyenne maximale atteinte au 42^e jour reste sensiblement inférieure à 5 mmol/L et demeure dans les valeurs physiologiques de l'espèce. En outre, nos données ne témoignent que d'une augmentation tardive et biologiquement non significative de la natrémie.

La majoration de la kaliémie au cours du stockage de culot globulaire de chien telle qu'observée dans notre étude, semble beaucoup moins importante que celle rapportée en humaine (Verma *et al.* 2015), (Obrador *et al.* 2015). Ainsi, à l'inverse des recommandations humaines, notre travail suggère que chez le chien, le risque d'hyperkaliémie induite par une transfusion soit faible à nul même avec un culot globulaire conservé longtemps.

Au-delà de la kaliémie et de la natrémie, nos données témoignent d'une augmentation de la chlorémie dès le 21^{ème} jour de conservation. Bien que non décrite dans les études transfusionnelles humaine, cette observation est en accord avec l'étude vétérinaire de Wilson (Wilson et al., 2017). Pouvant résulter d'un équilibrage des charges ioniques entre les érythrocytes et le plasma ou de la lyse des érythrocytes durant le stockage, les conséquences transfusionnelles de cette augmentation de chlorémie n'ont à ce jour pas encore été décrites et restent à explorer.

C. Modifications biochimiques

La principale observation issue de notre étude concerne l'évolution de l'ammoniémie au cours du stockage à froid de culot globulaire de chien. Rapportée aussi dans diverses études humaines (Verma et Dahiya, 2015), (Latham *et al.*, 1982), cette majoration est généralement attribuée au métabolisme cellulaire et à la désamination d'acides aminés qui produit des ions ammonium habituellement métabolisés en urée par le foie. L'adénine, élément constituant la solution anticoagulante et conservatrice CPDA est en effet une source d'ATP pour les érythrocytes, mais conduit à la production d'ammonium. Il apparaît donc cohérent d'observer une majoration linéaire de l'ammoniémie avec la durée de stockage.

Nos données sont en accord avec les précédentes études de médecine vétérinaire consacrées à ce sujet (Wilson *et al.*, 2017). Néanmoins, nos données semblent indiquer que l'ammoniémie augmente plus précocement mais avec une moindre amplitude que ce qui avait été précédemment décrit. Si nous observons une majoration significative de l'ammoniémie dès le 14^{ème} jour, cette augmentation, estimée dans nos conditions de stockage en moyenne à x 9,8 au 42^{ème} jour, reste néanmoins sensiblement moindre que ce qui avait été décrit (Verma et Dahiya, 2015), (Latham *et al.*, 1982).

Il n'en reste pas moins que cette observation soulève une interrogation concernant les risques transfusionnels de tels produits sanguins après une conservation de plus de 14-21 jours. Bien que cette majoration de l'ammoniémie soit bien établie, les risques associés à leur transfusion restent mal identifiés notamment chez des patients en insuffisance hépatique et/ou en encéphalopathie métabolique.

Nos observations sur l'évolution de la bilirubinémie totale au sein des culots globulaires au cours du temps restent mal explicables. Une hémolyse ainsi qu'une modification de la couleur du plasma pourraient être à l'origine de ces changements, même si nos données hématologiques et l'aspect visuel du plasma ne permettent pas de supporter cette hypothèse.

D. Modifications hématologiques

En matière d'évolution des données hématologiques au cours du stockage de culot globulaire de chien, les données restent assez parcellaires. Nous montrons dans cette étude que la numération de la lignée rouge et la numération de la lignée blanche ne varient de façon significative au cours des 42 jours de stockage. Nos données n'indiquent qu'une modification inconstante de la concentration corpusculaire moyenne des hématies sans pour autant être associée à une modification du volume globulaire moyen.

En médecine humaine, certaines études ont cependant mis en évidence une modification du Volume Globulaire Moyen des hématies que les auteurs associent microscopiquement aux lésions de stockage intervenant sur les érythrocytes (Latham *et al.*, 1982).

Bien que nous n'ayons pas évalué la fragilité érythrocytaire au cours du stockage, ni même cherché directement à quantifier l'hémolyse au sein des poches au cours du stockage, l'absence de variation tant de la numération rouge que de l'hématocrite ou de la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ne semblent pas indiquer d'hémolyse dans nos conditions de stockage à froid. L'absence de modification de la couleur du plasma au cours du stockage est, elle aussi, peu en faveur d'une hémolyse dans nos conditions de stockage. Évaluer l'aspect visuel du plasma après centrifugation reste néanmoins une méthode peu fiable car celle-ci tend à sous-estimer l'hémolyse d'un échantillon (Hawkins, 2002).

E. Limites de notre étude

Cette étude conduite sur un effectif restreint de culot globulaire témoigne néanmoins de variations électrolytiques et acido-basiques statistiquement significatives, malgré des conditions de stockage conformes aux recommandations les plus strictes actuellement en vigueur en médecine transfusionnelle vétérinaire.

Ce travail présente néanmoins un certain nombre de limites qui méritent d'être prises en considération.

Bien que conforme aux effectifs de poches classiquement utilisées pour conduire ce type d'étude, seules 5 poches de sang ont été suivies jusqu'au 42^e jour. Un tel effectif est à l'origine d'un possible manque de puissance et d'une limitation des possibilités d'analyse statistique. En fait, 6 chiens ont été prélevés, mais à la suite d'une manipulation accidentelle l'un des concentrés globulaires n'a pas pu être suivi sur l'ensemble de la période d'étude car la poche avait été irrémédiablement abîmée.

Une autre limite de cette étude repose sur un aléas technique survenu sur l'analyseur PrimeVet. Une panne liée à une obstruction du circuit de prélèvement automatisé a nécessité un changement à l'identique d'analyseur entre le jour 14 et le jour 21.

Conclusion

Notre étude décrit au cours du stockage à froid de culots globulaires de chien l'existence de modifications variées au plan biochimique notamment électrolytiques. Ces résultats originaux témoignent que ces changements s'opèrent bien avant la durée limite de conservation de 42 jours recommandée aujourd'hui.

Ainsi, nous montrons que le pH, le glucose et la concentration en bicarbonates tendent à diminuer tandis que la concentration en ammoniacque, en lactate, ainsi que la natrémie, la kaliémie et la chlorémie augmentent significativement au sein des culots globulaires de chien conservés à froid.

Ces données sont globalement en accord avec celles déjà connues et issues de la médecine transfusionnelle vétérinaire. Ainsi, nos travaux confirment l'existence de différences entre les données vétérinaires et humaines, notamment en terme de variation de la kaliémie.

En médecine vétérinaire, nous ne disposons à ce jour que d'assez peu de données prospectives permettant d'établir si les changements observés peuvent avoir ou non un impact péjoratif pour les patients transfusés. Néanmoins comme le suggèrent diverses études conduites en médecine humaine, la transfusion d'un sang stocké plus longtemps pourrait présenter chez certaines catégories de patients critiques, un impact négatif sur leur pronostic vital.

Néanmoins, nous avons observé des variations sensiblement différentes de celles rapportées en médecine humaine. Ainsi, certaines conséquences observées en médecine humaine pourraient ne pas être directement transposables à la médecine vétérinaire. Cette remarque concerne notamment l'hyperkaliémie induite par la transfusion de sang conservé longtemps, qui bien connue en médecine humaine reste, comme en témoigne nos résultats, peu probable en médecine vétérinaire.

D'un point de vue pratique, soulignons que les résultats de la présente étude supportent clairement la règle interne régissant la banque de sang du service d'anesthésie-réanimation-urgence-soins intensifs du ChuvA qui considère que seuls des dérivés sanguins figurés ayant moins de 28-35 jours sont acceptables à la transfusion.

Cette précaution limitative et protectrice des patients recourant actuellement à cette banque de sang souligne néanmoins l'intérêt de futures études visant à déterminer de façon précise la nature et l'incidence des risques associée à la transfusion d'un sang stocké plus longtemps.

Liste des références bibliographiques

BAILEY D.N., BOVE J.R. (1975) Chemical and hematological changes in stored CPD blood. *Transfusion* 15(3), 244-249

BUEHLER P.W., D'AGNILLO F. (2010) Toxicological consequences of extracellular hemoglobin: biochemical and physiological perspectives. *Antioxid Redox Signal* 12(2), 275-291

CASTRANOVA V., WEISE M.J., HOFFMAN J.F. (1979) Anion transport in dog, cat, and human red cells. Effects of varying cell volume and Donnan ratio. *J Gen Physiol.* 74(3), 319-334

CHAPUIS D. (2009) Transfusion sanguine chez le chien et le chat : bonnes pratiques actualisées d'après les recommandations de l'AVHTM. *Thèse de doctorat vétérinaire, ENVL.*

CHIARAMONTE D. (2004) Blood-component therapy: selection, administration and monitoring. *Clin Tech Small Anim Pract* 19(2), 63-67

D'ALESSANDRO A., KRIEBARDIS A.G., RINALDUCCI S., *et al.* (2015) An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies. *Transfusion* 55(1), 205-219

D'ALESSANDRO A., CULP-HILL R., REISZ J.A., *et al.* (2019) Heterogeneity of blood processing and storage additives in different centers impacts stored red blood cell metabolism as much as storage time: lessons from REDS-III—Omics. *Transfusion* 59(1), 89-100

GRIOT-WENK M.E., GIGER U. (1995) Feline Transfusion Medicine: Blood Types and their Clinical Importance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 25(6), 1305-1322

HANN L., BROWN D. c., KING L. g., CALLAN M. b. (2014) Effect of Duration of Packed Red Blood Cell Storage on Morbidity and Mortality in Dogs After Transfusion: 3,095 cases (2001–2010). *J Vet Intern Med.* 28(6), 1830-1837

HAWKINS R. (2002) Discrepancy between visual and spectrophotometric assessment of sample haemolysis. *Ann Clin Biochem* 39(Pt 5), 521-522

HEDDLE N.M., COOK R.J., ARNOLD D.M., *et al.* (2016) Effect of Short-Term vs. Long-Term Blood Storage on Mortality after Transfusion. *N Engl J Med* 375(20), 1937-1945

HEIREMAN L., VAN GEEL P., MUSGER L., *et al.* (2017) Causes, consequences and management of sample hemolysis in the clinical laboratory. *Clin Biochem* 50(18), 1317-1322

JEREMIAH Z.A., MOORE-IGWE B. (2012) Storage Related Haematological and Biochemical Changes of CPDA-1 Whole Blood in a Resource Limited Setting. *J Blood Disorders Transf* 3(3), 4

KARON B.S., VAN BUSKIRK C.M., JABEN E.A., HOYER J.D., THOMAS D.D. (2012) Temporal sequence of major biochemical events during Blood Bank storage of packed red blood cells. *Blood Transfus* 10(4), 453-461

KOCH C.G., LI L., SESSLER D.I., *et al.* (2008) Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med* 358(12), 1229-1239

LATHAM J.T., BOVE J.R., WEIRICH F.L. (1982) Chemical and hematologic changes in stored CPDA-1 blood. *Transfusion* 22(2), 158-159

- LELUBRE C., PIAGNERELLI M., VINCENT J.-L. (2009) Association between duration of storage of transfused red blood cells and morbidity and mortality in adult patients: myth or reality? *Transfusion* 49(7), 1384-1394
- MOLLISON P.L., (2000) The Introduction of Citrate as an Anticoagulant for Transfusion and of Glucose as a Red Cell Preservative. *Br J Haematol.* 108(1), 13-18
- PATTERSON J., ROUSSEAU A., KESSLER R.J., GIGER U. (2011) In vitro lysis and acute transfusion reactions with hemolysis caused by inappropriate storage of canine red blood cell products. *J Vet Intern Med* 25(4), 927-933
- RODRIGUES R.R., KAYANO C.Y., SANTOS V.P. dos, *et al.* (2020) Evaluation of hematologic, biochemical, and blood gas variables in stored canine packed red blood cells, and the impact of storage time on blood recipients. *Vet Clin Pathol.* 49(2), 198-206
- ROUS P., TURNER J.R. (1916) the preservation of living red blood cells in vitro. *J Exp Med* 23(2), 219-237
- SCOTT K.L., LECAK J., ACKER J.P. (2005) Biopreservation of Red Blood Cells: Past, Present, and Future. *Transfus Med Rev* 19(2), 127-142
- SINK C.A. (2017) Practical Transfusion Medicine for the Small Animal Practitioner. 2nd Edition, Ames, Iowa, *Wiley Blackwell*
- SOLOMON S.B., WANG D., SUN J., *et al.* (2013) Mortality increases after massive exchange transfusion with older stored blood in canines with experimental pneumonia. *Blood* 121(9), 1663-1672
- VALERI C.R., COLLINS F.B. (1971) Physiologic effects of 2,3-DPG-depleted red cells with high affinity for oxygen. *J Appl Physiol* 31(6), 823-827
- VERMA M., DAHIYA K. (2015) Effect of Blood Storage on Complete Biochemistry. *J Blood Disord Transfus* 6(6) doi:10.4172/2155-9864.1000329
- VOSTAL J.G., BUEHLER P.W., GELDERMAN M.P., *et al.* (2018) Proceedings of the Food and Drug Administration's public workshop on new red blood cell product regulatory science 2016. *Transfusion* 58(1), 255-266
- WARDROP K.J. (1995) Selection of anticoagulant-preservatives for canine and feline blood storage. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 25(6), 1263-1276
- WARDROP K.J., REINE N., BIRKENHEUER A., *et al.* (2005) Canine and Feline Blood Donor Screening for Infectious Disease. *J Vet Intern Med.* 19(1), 135-142
- WILSON C.R., PASHMAKOVA M.B., HEINZ J.A., *et al.* (2017) Biochemical evaluation of storage lesion in canine packed erythrocytes. *J Small Anim Pract* 58(12), 678-684
- WRIGHT A.E. (1893) On a Method of Determining the Condition of Blood Coagulability for Clinical and Experimental Purposes, and on the Effect of the Administration of Calcium Salts in Hæmophilia and Actual or Threatened Hæmorrhage. *Br Med J* 2(1700), 223-225
- YAGI K., HOLOWAYCHUK M. (2016) Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking. Ames, Iowa, Wiley Blackwell

INFLUENCE DE LA CONSERVATION DU CULOT GLOBULAIRE CANIN SUR LA COMPOSITION ÉLECTROLYTIQUE DU PRODUIT TRANSFUSÉ

AUTEUR : Ariane WILLAME

RÉSUMÉ :

Le culot globulaire est un concentré érythrocytaire obtenu après centrifugation de sang total. Selon les recommandations actuelles, ce concentré peut être conservé à froid dans une solution de CPDA pendant 42 jours. Cependant, de précédentes études en médecine humaine et en médecine vétérinaire ont montré que des modifications s'opèrent au sein des poches de culot globulaire bien avant la fin de la durée de stockage établie par les recommandations.

Cette étude, conduite au sein la banque de sang de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) a pour objectif de mieux comprendre et quantifier les changements biochimiques et hématologiques qui apparaissent au fur et à mesure du stockage au sein du culot globulaire canin.

Cinq culots globulaires provenant de chiens sains de race Golden Retriever ont été prélevés et stockés à froid dans une solution CPDA pendant 42 jours. Des mesures ont été effectuées au jour du prélèvement noté J0, ainsi qu'aux jours J1, J3, J7, J14, J21, J28, J35 et J42. Les analyses comprennent à chaque fois un ionogramme et gaz du sang, une numération formule sanguine, ainsi qu'une biochimie dix paramètres.

Les données recueillies ont montré une diminution du pH, du glucose et de la concentration en bicarbonates, et une augmentation de la concentration en bilirubine, en ammoniacque, en lactate, ainsi qu'en sodium, potassium et chlore. Les paramètres hématologiques mesurés n'ont pas connu de modifications significatives au cours du stockage.

Ces résultats sont similaires à ceux observés dans la littérature. Cependant certains électrolytes, comme le potassium, semblent avoir des variations moins importantes en médecine vétérinaire que celles ayant pu être observées en médecine humaine.

D'autres études en médecine vétérinaires seront donc nécessaires pour savoir si la transfusion d'un sang stocké plus longtemps peut avoir un impact sur la survie de certaines catégories de patients. Nos observations supportent néanmoins la possibilité d'envisager une conservation de 35 à 42 jours de culot globulaire de chien.

MOTS CLÉS : CULOT GLOBULAIRE, CONCENTRÉ ÉRYTHROCYTAIRE, STOCKAGE, TRANSFUSION, CHIEN

JURY :

Président : Pr Sylvain Bellier

Directeur de thèse : Pr Patrick Verwaerde

Examineur : Dr Pierre Deshuillers

Invitée : Dr Alix Barbarino

EFFECT OF THE STORAGE ON CANINE RED BLOOD CELL CONCENTRATE'S BIOCHEMISTRY

AUTHOR: Ariane WILLAME

SUMMARY:

Red Blood Cell Concentrate is a concentrate of erythrocytes obtained by centrifugation of fresh whole Blood. According to actual recommendations, this concentrate can be stored on CPDA anticoagulant at low temperatures for up to 42 days. Nonetheless, previous studies in both human and veterinary medicine tend to show that changes appear in those products long before those recommended 42 days.

This prospective study was performed with the Blood Bank of the National Veterinary School of Alfort (ENVA). The aim of the study was to understand and to quantify changes appearing during the storage of packed Red Blood Cell Concentrate.

Five Red Blood Cell Concentrates were collected from healthy Golden Retriever dogs and stored at low temperature in CPDA anticoagulant for 42 days. Analysis were performed on the drawing day, referred as J0 in this study, and on days J1, J3, J7, J14, J21, J28, J35 and J42. A complete biochemistry, blood gas, electrolytes and a complete blood count were performed at each defined time.

The data collected show a decrease in pH and in glucose and bicarbonates concentration, and an increase in ammonium, lactate, sodium, potassium and chloride concentrations. Haematological parameters showed no significant changes during storage.

Those results are similar to studies performed in human medicine. Still, some parameter like potassium seems to show a smaller variation compared to those reported in human medicine.

Further studies in the veterinary field are needed to know whether transfusion of long time stored Canine Red Blood Cell Concentrates can have an impact on some specific patient's survival. Nevertheless, our observations suggest that a 35 to 42 day long storage of Canine Red Blood Cell Concentrates is acceptable.

KEYWORDS: RED BLOOD CELL CONCENTRATE, PACKED ERYTHROCYTE, STORAGE, STOCKAGE, TRANSFUSION, DOG

JURY:

Chairperson: Pr Sylvain Bellier

Thesis Director: Pr Patrick Verwaerde

Reviewer: Dr Pierre Deshuillers

Guest: Dr Alix Barbarino



Comité d'Éthique en Recherche Clinique (ComERC)
Ecole nationale vétérinaire d'Alfort
7, avenue du Général de Gaulle
94704 Maisons-Alfort Cedex

A Madame Alix Barbarino

Maisons-Alfort le, 03 février 2022

N° du dossier : 2021-11-26

Objet : Avis du ComERC

Madame,

Le ComERC a procédé à l'examen de votre saisine concernant le projet intitulé «Influence de la conservation du culot globulaire canin sur la composition électrolytique du produit transfusé» et vous informe que votre projet a reçu un Avis favorable.

Veillez croire, Madame, en l'expression de nos salutations distinguées.

Pour le ComERC, sa Présidente.
Caroline GILBERT

École nationale vétérinaire d'Alfort
7, avenue du Général de Gaulle – 94704 Maisons-Alfort Cedex
Tel: 33 (0)1 43 96 71 00 – Fax: 33 (0)1 43 96 71 25 – www.vet-alfort.fr
SIRET: 199 406 083 000 14 – N° TVA: FR55 199 406 083

