



**HAL**  
open science

# Concentrés de globules rouges et lésions de stockage : analyse par l'Osmocells® (SD innovation), évaluation de la fragilité osmotique au cours du stockage

Emmanuelle Stein

## ► To cite this version:

Emmanuelle Stein. Concentrés de globules rouges et lésions de stockage : analyse par l'Osmocells® (SD innovation), évaluation de la fragilité osmotique au cours du stockage. Sciences pharmaceutiques. 2020. hal-03298182

**HAL Id: hal-03298182**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03298182>**

Submitted on 23 Jul 2021

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE



FACULTÉ  
DE PHARMACIE

UNIVERSITE DE LORRAINE  
2020

---

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE**  
**du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 27 octobre 2020

Par Emmanuelle STEIN  
née le 31 janvier 1993 à Metz

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT**  
**de DOCTEUR en PHARMACIE**

---

**Concentrés de globules rouges et lésions de stockage : analyse par l'Osmocells® (SD Innovation), évaluation de la fragilité osmotique au cours du stockage**

---

Membres du Jury

Président : Mme le Professeur B. FAIVRE, PU, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : M. le Docteur J. PERRIN, MCU-PH, CHRU de Nancy, Directeur de thèse  
M. le Professeur J-Y JOUZEAU, PU-PH, CHRU de Nancy  
M. J. COLLIN, Directeur Biomédical SD Innovation

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2019-2020**

***DOYEN***

Raphaël DUVAL

***Vice-Doyen***

Julien PERRIN

***Directrice des études***

Marie SOCHA

***Conseil de la Pédagogie***

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

***Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier***

Présidente, Béatrice DEMORE

***Commission Prospective Facultaire***

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

***Commission de la Recherche***

Présidente, Caroline GAUCHER

***Chargés de Mission***

***Communication***

***Innovation pédagogique***

***Référente ADE***

***Référente dotation sur projet (DSP)***

***Référent vie associative***

Aline BONTEMPS

Alexandrine LAMBERT

Virginie PICHON

Marie-Paule SAUDER

Arnaud PALLOTTA

***Responsabilités***

***Filière Officine***

***Filière Industrie***

***Filière Hôpital***

***Pharma Plus ENSIC***

***Pharma Plus ENSAIA***

***Pharma Plus ENSGSI***

***Cellule de Formation Continue et Individuelle***

***Commission d'agrément des maîtres de stage***

***ERASMUS***

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Xavier BELLANGER

Igor CLAROT

Luc FERRARI

François DUPUIS

Mihayl VARBANOV

***DOYENS HONORAIRES***

Chantal FINANCE

Francine PAULUS

Claude VIGNERON

***PROFESSEURS EMERITES***

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Pierre LEROY

Philippe MAINCENT

Claude VIGNERON

***PROFESSEURS HONORAIRES***

Jean-Claude BLOCK

Pierre DIXNEUF

Chantal FINANCE

Marie-Madeleine GALTEAU

***MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES***

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

François BONNEAUX

Gérald CATAU

Thérèse GIRARD  
 Pierre LABRUDE  
 Vincent LOPPINET  
 Alain NICOLAS  
 Janine SCHWARTZBROD  
 Louis SCHWARTZBROD

Jean-Claude CHEVIN  
 Jocelyne COLLOMB  
 Bernard DANGIEN  
 Marie-Claude FUZELLIER  
 Françoise HINZELIN  
 Marie-Hélène LIVERTOUX  
 Bernard MIGNOT  
 Blandine MOREAU  
 Dominique NOTTER  
 Francine PAULUS  
 Christine PERDICAKIS  
 Marie-France POCHON  
 Anne ROVEL  
 Gabriel TROCKLE  
 Maria WELLMAN-ROUSSEAU  
 Colette ZINUTTI

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
 Annie PAVIS

**ENSEIGNANTS**

Section CNU\*

Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPEL	82	Biothérapie
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Xavier BELLANGER <sup>H</sup>	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT <sup>H</sup>	86	Communication et Santé

Isabelle BERTRAND <sup>H</sup>	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA <sup>H</sup>	86	Physiologie
Sandrine CAPIZZI	87	Parasitologie
Antoine CAROF	85	Informatique
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Natacha DREUMONT <sup>H</sup>	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY <sup>H</sup>	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS <sup>H</sup>	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER <sup>H</sup>	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD <sup>H</sup>	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT <sup>H</sup>	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	<b>Section CNU*</b>	<b>Discipline d'enseignement</b>

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN <sup>H</sup>	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER <sup>H</sup>	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA	85	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL <sup>H</sup>	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET <sup>H</sup>	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT <sup>H</sup>	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU <sup>H</sup>	87	Biochimie et Biologie moléculaire

#### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
------------------	----	--------------------

#### **PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

<sup>H</sup> Maître de conférences titulaire HDR

\* *Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

## **SERMENT DE GALIEN**

**En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité**

**En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession**

**De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens**

**De coopérer avec les autres professionnels de santé**

**Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.**

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI  
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES  
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A  
LEUR AUTEUR ».

# Remerciements

**A Madame le Professeur Béatrice FAIVRE, Président du jury.**

*PU de la faculté de Pharmacie de Nancy, Hématologie.*

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**A Monsieur le Docteur Julien PERRIN, Directeur de thèse.**

*MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy, Service d'Hématologie Biologique - CHRU de Nancy.*

Je te remercie sincèrement pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce travail, pour ton soutien et tout le temps que tu m'as consacré au cours de cette thèse. Je te remercie également pour ta grande disponibilité.

Sois assuré de ma sincère reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU, Membre du jury.**

*PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Service de Pharmacologie-Toxicologie - CHRU de Nancy.*

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'apporter vos connaissances à la critique de cette thèse.

Veillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

**A Monsieur Julien COLLIN, Membre du jury.**

*Directeur Biomédical SD Innovation.*

Je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apporté pour la réussite de ce travail ainsi que ta grande disponibilité malgré tous les aléas de ces derniers mois.

Sois assuré de mon grand respect et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie également Viviane du laboratoire d'Hématologie pour sa gentillesse et sa disponibilité ainsi que toute l'équipe de SD Innovation et l'EFS de Nancy sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

## *A toute ma famille*

### **A mes parents**

Merci pour votre soutien et votre patience tout au long de ces années d'études mais aussi pour tous les bons Tupperwares !

L'aboutissement de ce travail est aussi votre réussite ! (au 1/112<sup>ème</sup> du petit biscuit plus précisément)

### **A mes frères, Fred, Flo et Seb**

A Fred et sa petite famille Justine et Gabriel, le petit dernier de la famille Stein qui était d'ailleurs avec moi pour l'écriture de ces remerciements. Tu n'as pas fini d'en voir des choses dans cette famille !

A Flo, le futur canadien qui était censé ne plus être là pour ma thèse. A c't'heure, j'espère que tu seras présent au pot de thèse. Merci Covid-19... Tu es badloqué... Tabarnak ! J'espère que tu n'auras pas la dalle basse, lâche pas la patate ! (je jase bien le québécois !)

Sebi, le petit doudou. On en aura fait des restaurants grâce à cette thèse ! Merci de m'avoir gracieusement accueillie chez toi cette année. Comme on dit, à plus dans le bus. Oh Yeah !!!

### **A mes grands-parents,**

### **A mes oncles et tantes, cousins cousines et petits cousins petites cousines.**

A tous mes **amis** et à toutes les personnes rencontrées lors de ces quatre belles années d'internat,

**Marion,**

Ma binôme de toujours de la fac, sans qui ces années n'auraient pas été pareilles !

Merci de m'avoir supportée pendant si longtemps (et pendant encore un bon moment j'espère !!!)

Tu es aussi ma binôme de voyage. Alors après nos thèses, il ne nous reste plus qu'à voyager !

**Carole,**

Tu as été ma co-interne des deux premières années d'internat, de la parasito avec Shanti jusqu'à l'hémato. Tous ces moments mémorables et soirées passées, ça ne s'oublie pas ! J'espère que les Alsaciens seront gentils avec toi.

Comme on le disait souvent, c'est beau, comme le jambonneau !

**Elodie et Josepha,**

Pour toutes ces soirées fort sympathiques sur Nancy à refaire le monde ! J'espère que tout se passera bien pour vous !

**Claire,** que dire à part que vous êtes parfaite ! Tu l'as montré pendant le stage d'hémato mais aussi en m'accueillant pour mon dernier stage !

**Charlotte,** les festifs se reconnaissent bien ! Nul besoin de dire autre chose.

**Allison,**

Le fameux duo "sun-morue" qui existe depuis nos jeunes années de maternelles.

Qui aurait cru qu'on partirait en road trip au Canada, roulant avec notre petite voiture au milieu des forêts canadiennes ?

Merci d'être ma Mamie branchée !

**Clémentine,**

Ma partenaire de course à pieds,

On a bientôt fini de faire nos "points thèse" en courant. Tu as été la première à passer ta thèse alors vivement la première séance de course post-thèse !

A Julie, Nico et Alex ...

A tous les autres co-internes et personnes que je n'ai pas cités dans ces remerciements.

## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>8</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>10</b>
<b>PARTIE I : GENERALITES SUR LES PRODUITS SANGUINS LABILES</b> .....	<b>11</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>12</b>
<b>I. Le don</b> .....	<b>12</b>
1. Don de sang total .....	12
2. Don en aphérèse.....	13
<b>II. Préparation des PSL</b> .....	<b>14</b>
1. Préparation primaire .....	14
a) Préparation du sang total prélevé sur un DMU à quadruple poches .....	14
b) Préparation du sang total prélevé sur un DMU à quintuple poches .....	16
2. Transformations applicables aux PSL .....	18
a) Irradiation .....	18
b) Déplasmatisation .....	18
c) Cryoconservation .....	18
d) Réduction de volume.....	19
e) Préparation pédiatrique.....	19
f) Sang total reconstitué à usage pédiatrique.....	19
g) Mélange .....	19
h) Ajout de la solution de conservation .....	19
i) Viro-atténuation .....	19
3. Qualification .....	20
a) Phénotypé .....	20
b) Phénotype étendu .....	20
c) Compatibilisé .....	20
4. Qualification biologique .....	21
a) Les analyses obligatoires .....	21
b) Les analyses effectuées en fonction du contexte épidémiologique ou clinique .....	22
5. Caractéristiques des CGR .....	23

<b>III. Distribution et délivrance.....</b>	<b>24</b>
<b>PARTIE II : LESIONS DE STOCKAGE DES CONCENTRES DE GLOBULES ROUGES.....</b>	<b>25</b>
<b>I. Lésions de stockage .....</b>	<b>26</b>
1. Altération du métabolisme érythrocytaire.....	26
a) La glycolyse et l'acidose .....	26
b) L'ATP .....	28
c) Pompe sodium-potassium.....	28
d) 2-3 DPG.....	29
2. Stress oxydant.....	29
3. Modifications morphologiques et structurelles.....	29
a) Morphologie.....	30
b) Composition membranaire.....	33
4. Hémolysé.....	34
<b>II. Réversibilité des lésions.....</b>	<b>35</b>
<b>III. Cas particulier de la fragilité osmotique des CGR au cours du stockage .....</b>	<b>36</b>
1. Erythrocytes et fragilité osmotique.....	36
a) Hémolysé brutale .....	37
b) L'hémolysé douce.....	38
c) Cytométrie en flux .....	42
d) L'Osmocells® .....	43
2. Evolution de la fragilité osmotique des CGR au cours du stockage .....	43
<b>IV. Variabilité inter et intra donneur de la qualité des CGR .....</b>	<b>45</b>
1. Facteurs non génétiques.....	45
a) Le style de vie .....	45
b) Conditions médicales du donneur .....	46
c) Autres facteurs .....	46
2. Facteurs génétiques.....	47
<b>V. Impact des lésions de stockage.....</b>	<b>49</b>
1. Efficacité de la transfusion.....	49
a) Viabilité des globules rouges : hémolysé pré-transfusionnelle et post-transfusionnelle.....	49
b) Impact des microvésicules.....	49
c) Morphologie et rhéologie des globules rouges.....	50

2.	Impact clinique des lésions de stockage des CGR .....	52
a)	Effets indésirables receveur (EIR) liés aux lésions de stockage.....	52
b)	Lien entre la durée de stockage des CGR et l'impact clinique des lésions de stockage .....	56
<b>PARTIE III : ETUDE DE LA FRAGILITE OSMOTIQUE DES CGR AU COURS DU STOCKAGE .....</b>		<b>58</b>
<b>Objectifs.....</b>		<b>58</b>
<b>I. Matériels et méthodes.....</b>		<b>59</b>
1.	Population étudiée .....	59
2.	Production de CGR par l'EFS.....	59
3.	Protocole et présentation de l'Osmocells®.....	60
a)	Protocole.....	60
b)	L'Osmocells®.....	61
c)	Planning des manipulations .....	64
<b>II. Résultats.....</b>		<b>65</b>
1.	Caractéristiques des donneurs.....	65
2.	Résultats.....	68
a)	Fragilité osmotique des tubes EDTA à J0 .....	68
b)	Fragilité osmotique des CGR à J+1 .....	69
c)	Fragilité osmotique des CGR à J+20 de stockage.....	70
d)	Fragilité osmotique des CGR à J+40 de stockage.....	71
e)	Variation de l'hémolyse au cours du stockage .....	72
<b>III. Discussion .....</b>		<b>77</b>
1.	Lésions issues de la préparation .....	77
a)	Variation de la qualité des dispositifs de prélèvements.....	78
b)	Solution anticoagulante .....	78
c)	Centrifugation, séparation.....	78
d)	Filtration .....	80
e)	Solution de conservation .....	80
f)	Variations de la température.....	80
g)	Variabilité intra et inter donneur.....	80
2.	Lésions issues du stockage.....	81
3.	Limites de l'étude .....	82
<b>Conclusion générale.....</b>		<b>83</b>

<b>Bibliographie .....</b>	<b>84</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>93</b>
<b>I. Indications des CGR.....</b>	<b>94</b>
1. Anémie aiguë.....	94
2. Anémie hémolytique auto-immune.....	94
3. Seuils transfusionnels en gériatrie.....	94
4. Micro angiopathies thrombotiques, hémolyse mécanique sur valve.....	95
5. Néonatalogie.....	95

## Liste des abréviations

ACD : Acide citrique, Citrate, Dextrose  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé  
ARN : Acide RiboNucléique  
ATP : Adénosine-Tri-Phosphate  
CGR : Concentrés de Globules Rouges  
CL : Cholestérol  
CMV : Cytomégalovirus  
CP : Concentré de Plaquettes  
CPA : Concentré Plaquettaire d'Aphérèse  
CPD : Citrate Phosphate Dextrose  
CPDA : Citrate Phosphate Dextrose, Adénine  
CTSA : Centre de Transfusion Sanguine des Armées  
DGV : Diagnostic Génomique Viral  
DHEP : DiEthylHexyl Phthalate  
DMU : Dispositifs Médicaux à Usage unique  
DPG : Di-Phospho-Glycérol  
EBV : Epstein-Barr Virus  
EFS : Etablissement Français du Sang  
EIR : Effet Indésirable Receveur  
FO : Fragilité Osmotique  
GR : Globules Rouges  
GSH : Glutathion  
GSSG : Disulfure de Glutathion  
GVH : Greft Versus Host  
HLA : Human Leucoyte Antigen  
HTLV : Human T-Lymphotropic Virus  
IL : Interleukine  
LP : Leuco-Plaquettaire  
MCF : Mean Corpuscular Fragility  
MCPS : Mélange de Concentrés Plaquettaires Standards  
MDS : Médicament Dérivé du Sang  
MV : MicroVésicules  
NaCl : Chlorure de Sodium  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
NO : Nitrite d'Oxyde  
PFC : Plasma Frais Congelé  
PFC-IA : Plasma Frais Congelé Inactivé par Amotosalen  
PFC-SD : Plasma Frais Congelé viro-atténué par Solvant Détergent  
PFC-Se : Plasma Frais Congelé Sécurisé  
PL : Phospholipides

PPT : Purpura Post-Transfusionnel  
PS : Phosphatidylsérine  
PSL : Produit Sanguin Labile  
PVC : Polychlorure de vinyle  
RAI : Recherche d'Agglutinines Irrégulières  
RFNH : Réaction Fébrile Non Hémolytique  
ROS : Reactive Oxygen Species  
SAG-M : Sodium, Adénine, Glucose, Mannitol  
TACO : Transfusion Associated Circulating Overload  
TFO : Test de Fragilité Osmotique  
TnBP : tri n-butyl phosphate  
TRALI : Transfusion Related Acute Lung Injury  
UI : Unités Internationales  
VGM : Volume Globulaire Moyen

## Liste des tableaux

Tableau I: Évolution du risque résiduel viral.....	15
Tableau II: Évolution du dépistage biologique du don .....	22
Tableau III: Caractéristiques réglementaires des CGR .....	23
Tableau IV: Qualifications et transformations applicables aux CGR .....	24
Tableau V: Étude de la variation de la MCF au cours du stockage .....	43
Tableau VI: Valeurs de références issues de l'étude .....	64
Tableau VII: Planning des manipulations.....	64
Tableau VIII : Caractéristiques des donneurs.....	65
Tableau IX: Fragilité osmotique des tubes EDTA à J0 (n=19) .....	68
Tableau X: Fragilité osmotique des CGR à J+1 (n=19).....	69
Tableau XI : Variation de l'hémolyse osmotique J0 vs J1 (n=19).....	69
Tableau XII: Fragilité osmotique des CGR à J+20 (n=9) .....	70
Tableau XIII: Fragilité osmotique des CGR à J+40 (n=9) .....	71
Tableau XIV : Résumé des résultats de la troisième et de la quatrième série .....	71
Tableau XV : Résumé des résultats des séries.....	72

## Liste des figures

Figure 1 : Dispositif à quadruple poches.....	13
Figure 2 : Filtration des CGR.....	14
Figure 3 : Poches pliées puis mises en pot dans la centrifugeuse.....	15
Figure 4 : Automate de séparation.....	16
Figure 5: Résumé de la préparation des PSL.....	17
Figure 6: Glycolyse au cours du stockage.....	27
Figure 7 : Evolution de la surface des globules rouges au cours du stockage.....	31
Figure 8 : Evolution de la surface des érythrocytes au cours du stockage.....	32
Figure 9 : Morphologie des GR à J3 et J42.....	32
Figure 10 : Accumulation des microparticules au cours du stockage.....	33
Figure 11 : Les différents stades de l'échinocyte.....	35
Figure 12 : Evolution du discocyte en échinocyte.....	35
Figure 13 : Courbes d'hémolyse des érythrocytes.....	37
Figure 14 : Courbes d'hémolyse de Parpart.....	38
Figure 15 : Le Fragiligraph®.....	39
Figure 16 : Le Spinco-Analytrol.....	40
Figure 17 : Coil planet centrifuge.....	40
Figure 18 : Gradient de densité linéaire.....	41
Figure 19 : Coil planet centrifugation.....	41
Figure 20 : Résultats obtenus : une bande élargie vers le côté gauche correspond à une plus grande fragilité osmotique.....	42
Figure 21 : Méthode en flux continu.....	42
Figure 22 : MCF en fonction de la durée de stockage.....	44
Figure 23 : Courbes d'hémolyse à différents temps du stockage.....	44
Figure 24 : Corrélation de la fragilité osmotique J0 versus J42.....	47
Figure 25 : Perte de surface et rétention splénique.....	51
Figure 26 : Perte de surface et MCF.....	51
Figure 27 : EIR et CGR de 2013 à 2018.....	53
Figure 28 : Décès de 2013 à 2018.....	53
Figure 29: Poches de 20 mL.....	59
Figure 30 : Tube EDTA avec numéro d'anonymat.....	60
Figure 31 : Osmocells®.....	60
Figure 32 : Membrane semi-perméable.....	60
Figure 33 : Electrode.....	61
Figure 34 : Schéma de l'Osmocells®.....	62
Figure 35 : Courbes d'hémolyse de l'Osmocells®.....	63
Figure 36: Groupes sanguins et phénotypes RH 1 (D) des donneurs.....	66
Figure 37 : Phénotypes KEL1 (K) des donneurs.....	66
Figure 38: Phénotype Rhésus (1 à 5) des donneurs.....	67
Figure 39 : Evolution de l'hémolyse initiale au cours du stockage.....	72
Figure 40 : Evolution de l'hémolyse maximale au cours du stockage.....	73

Figure 41 : Evolution de l'hémolyse finale au cours du stockage.....	73
Figure 42 : Evolution de la MCF à J0 vs J1 de la première série .....	74
Figure 43 : Evolution de la MCF à J0 vs J1 de la deuxième série .....	74
Figure 44 : Evolution de la MCF de la troisième série.....	75
Figure 45 : Evolution de la MCF de la quatrième série .....	75
Figure 46 : Courbes d'hémolyse en fonction du stockage .....	76
Figure 47 : Hémolyse pré et post-préparation des CGR.....	79
Figure 48 : Ratio d'élongation de CGR pré et post-préparation.....	79
Figure 49 : De la collecte à la délivrance .....	81

## Introduction générale

Chaque année, environ trois millions de dons de sang sont collectés en France, pour plus de 1,6 millions de donneurs. En 2018, les produits sanguins labiles (PSL) ont été transfusés à 519 176 receveurs dont 51% de femmes et 49% d'hommes. Le taux de transfusion en France est de 7,7 receveurs pour 1000 habitants [1,2].

Les PSL sont encadrés par des règles strictes de préparation, de conservation, de transport et d'utilisation dans le but de sécuriser le circuit transfusionnel. Les milieux de conservation utilisés ainsi que les conditions de stockage permettent de ralentir le vieillissement des érythrocytes au cours du stockage. Malgré cela, des lésions apparaissent progressivement au fur et à mesure du stockage, ce sont les lésions dites de stockage. Elles se traduisent notamment par des altérations métaboliques et morphologiques érythrocytaires.

Les PSL sont soumis à des contrôles-qualité réglementés, notamment en mesurant le taux d'hémolyse à la fin du stockage. Actuellement, c'est le seul contrôle qualité représentatif des lésions de stockage. Il serait intéressant d'utiliser un autre paramètre, facilement réalisable en laboratoire de routine et reflétant les lésions de stockage dans le but d'améliorer le contrôle qualité des poches de sang. La mesure de la fragilité osmotique pourrait correspondre à ces critères. En effet, elle représente la fragilité des globules rouges à l'hémolyse soumis à un environnement hypotonique. Elle dépend de plusieurs facteurs, comme l'intégrité membranaire, le ratio surface/volume érythrocytaire mais aussi le métabolisme énergétique, facteurs qui sont altérés au cours du stockage.

Le but de ce travail a été d'étudier la fragilité osmotique des concentrés de globules rouges (CGR) au cours du stockage, en utilisant l'Osmocells® (conçu et commercialisé par SD Innovation) au sein du laboratoire d'Hématologie au CHRU de Nancy. Nous avons suivi le vieillissement des concentrés érythrocytaires dans des conditions de stockage identiques en mesurant la fragilité osmotique de neuf CGR à J+1, J+20 et J+40 du stockage.

L'intérêt de mesurer la fragilité osmotique le jour même du don serait de dépister des donneurs ayant une susceptibilité à l'hémolyse osmotique augmentée et donc une moindre performance de stockage.

Nous allons dans un premier temps nous intéresser aux PSL, en décrivant leur mode de préparation ainsi que les transformations et qualifications applicables. Nous détaillerons dans un second temps les lésions de stockage touchant les CGR et plus particulièrement la fragilité osmotique. Pour terminer, nous présenterons nos manipulations, nos résultats et nos discussions.

# **PARTIE I : GENERALITES SUR LES PRODUITS SANGUINS LABILES**

## Introduction

Les produits sanguins regroupent les PSL et les médicaments dérivés du sang (MDS), anciennement nommés les Produits Sanguins Stables.

Les PSL sont issus de dons de sang bénévoles, volontaires et anonymes, selon la loi du 4 janvier 1993. Deux types de dons existent, le don de sang total qui reste majoritaire et le don en aphérèse. Les PSL regroupent les Concentrés de Globules Rouges (CGR), les Concentrés de Plaquettes (CP), les Plasmas Frais Congelés (PFC) et les granulocytes. En 2018, 3 002 160 PSL ont été délivrés dont environ 80% de concentrés de CGR, 10% de CP et 10% de PFC.

Deux organismes sont en charge de la collecte, de la préparation, de la qualification et de la distribution des PSL, il s'agit de l'établissement français du sang (EFS) et du centre de transfusion des armées (CTSA).

On distingue les PSL homologues (destinés à une autre personne que le donneur) et les PSL autologues (destinés au donneur lui-même).

Les grandes étapes depuis le don jusqu'à la délivrance du PSL sont réglementées et comprennent :

- L'entretien pré-don et le prélèvement
- Le processus de préparation par le plateau technique
- La qualification biologique du don
- La délivrance

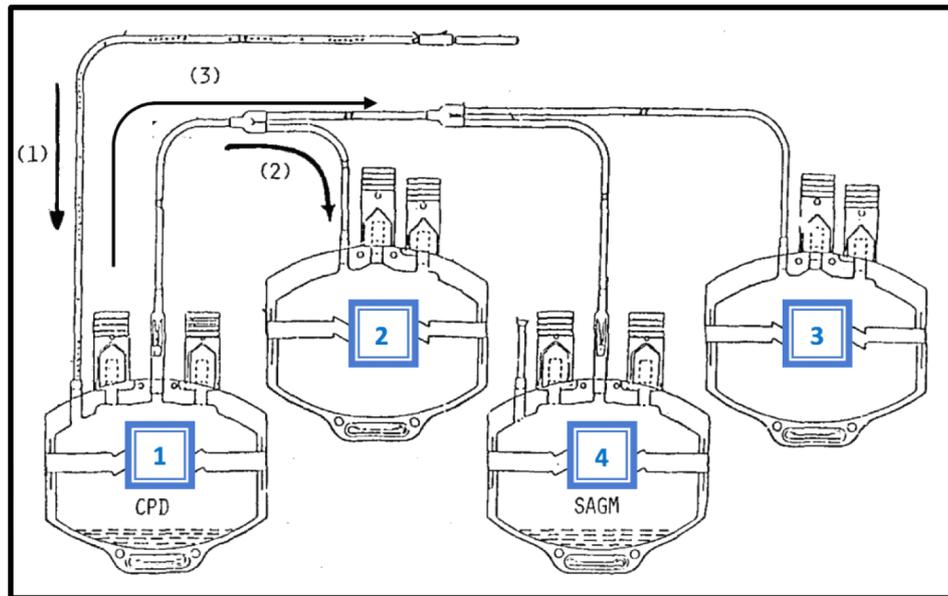
### I. Le don

Les prélèvements proviennent à 84% de dons de sang total et à 16% de dons d'aphérèse [2].

#### 1. Don de sang total [3-10]

Environ 400 à 500 mL de sang veineux sont prélevés aseptiquement dans un dispositif stérile constitué de plusieurs poches souples en plastique (Polychlorure de vinyle, PVC et Diethylhexyl phthalate, DHEP) reliées entre elles par des tubulures. Certaines poches sont munies de filtres permettant la déleucocytation. Les dispositifs de prélèvement sont des dispositifs médicaux à usage unique (DMU) composés de tous les éléments nécessaires à la préparation du « produit fini », ce qui garantit un circuit stérile et clos. Deux dispositifs existent, selon le PSL voulu :

- Le DMU à quadruple poches (figure 1) : dispositif avec filtre intégré pour le sang total qui retient les plaquettes et la majeure partie des leucocytes. Permet l'obtention d'un CGR et d'une unité de plasma.



**Figure 1 : Dispositif à quadruple poches [10]**

Dispositif constitué de quatre poches : une poche de recueil du sang total contenant un anticoagulant (Citrate Phosphate Dextrose, n°1), une poche de recueil du sang total filtré (n°2), une poche de recueil du plasma (n°3), une poche contenant la solution de conservation (environ 100 mL de solution SAG-M) composée de sodium, d'adénine, de glucose et de mannitol (n°4). Le citrate de sodium joue le rôle d'anticoagulant et de tampon, le glucose sert de substrat énergétique. L'adénine permet de maintenir des niveaux de 2-3 DPG et d'ATP suffisants au métabolisme des globules rouges. Pour finir, le mannitol permet de stabiliser la membrane érythrocytaire et de retenir les radicaux libres [11, 12, 13].

- Les DMU à quintuple poches : possèdent des filtres intégrés pour le CGR et le plasma, permettant d'obtenir un CGR et une unité de plasma déleucocytés ainsi qu'un CP non déleucocyté. Ce dispositif permet le recueil de la couche leuco plaquettaire qui sera destinée par la suite au poolage de plusieurs CP.

Dispositif constitué de cinq poches : une poche de recueil du sang total contenant un anticoagulant (CPD), une poche de recueil de la couche leuco plaquettaire, une poche de recueil du CGR déleucocyté, une poche de recueil du plasma déleucocyté et une poche contenant la solution de conservation.

## 2. Don en aphérèse [3-9]

L'aphérèse se fait grâce à un séparateur automatisé de cellules qui permet la centrifugation et la séparation des composants du sang au moment du don et qui réinjecte les composants du sang non utilisés au donneur. Ce mode de prélèvement a comme avantage de prélever un plus grand volume. On distingue l'aphérèse simple qui permet le recueil d'un seul produit dans le but d'en préparer deux unités et l'aphérèse combinée permet le recueil de deux produits distincts.

## II. Préparation des PSL [3-9]

La préparation des PSL regroupe l'ensemble des étapes nécessaires à la transformation du sang total recueilli en produit fini. Les prélèvements issus d'aphérèse ne seront pas détaillés dans ce travail étant donné que l'automate d'aphérèse réalise lui-même les étapes de préparation du PSL (séparation, filtration).

La préparation du PSL doit être réalisée dans les 2 à 24 heures après le prélèvement et le sang total peut être maintenu avant séparation à une température comprise entre +18°C et +24°C. En cas de préparation au-delà de 24 heures après le prélèvement (et au plus tard dans les 72 heures), le sang total est maintenu entre +2°C et +10°C.

Ce chapitre sera divisé en trois parties : la préparation primaire, la transformation et la qualification biologique.

### 1. Préparation primaire [3-9]

Le plateau technique de préparation réceptionne le sang « matière première », vérifie la concordance des informations transmises par le centre de prélèvement, pèse et mesure le volume de chaque poche. La prise en charge des prélèvements diffère selon le type de support utilisé pour le prélèvement.

#### a) Préparation du sang total prélevé sur un DMU à quadruple poches

Les étapes de préparation sont réalisées dans l'ordre suivant : filtration du sang total, centrifugation, séparation, ajout de la solution de conservation.

##### ➤ La filtration

La filtration du sang total consiste à transférer par gravité le sang total dans une deuxième poche à travers un filtre intégré au dispositif (figure 2). Le filtre permet de retenir une grande majorité des leucocytes et des plaquettes. La déleucocytation des PSL est une obligation réglementaire depuis 1998 et doit être réalisée au plus tard 24 heures après le prélèvement.



Figure 2 : Filtration des CGR [7]

Le but de la déleucocytation est de prévenir la transmission d'agents pathogènes tels que les virus, les bactéries mais aussi de prévenir l'immunisation HLA (*Human Leukocyte Antigen*).

Chez les donneurs de sang, la prévalence de nombreux agents pathogènes est inférieure à celle de la population générale. Le risque résiduel est défini comme étant le risque de ne pas repérer un donneur infecté, soit à cause de la fenêtre sérologique (phase de séroconversion) ou soit à cause du délai entre la contamination et l'apparition de la positivité en biologie moléculaire. La fenêtre sérologique est estimée à 9 jours pour le VIH, 7 jours pour le VHC et 22 jours pour le VHB [2, 14]. Le tableau ci-dessous expose les risques résiduels des virus les plus impliqués dans la transmission transfusionnelle (tableau I).

**Tableau I: Évolution du risque résiduel viral d'après [2, 14]**

Virus	Risque résiduel (RR)		
	Avant DGV (RR/million de don)		Après DGV
	1992-1994	1998-2000	2014-2016 [14]
VIH	1,67	0,73	1/3,6 millions de dons
VHB	8,87	2,13	1/4,1 millions de dons
VHC	4,6	1,16	1/24 millions de dons

DGV (diagnostic génomique viral)

D'autres virus peuvent être impliqués, tels que le virus de l'hépatite A, l'EBV, le Parvovirus B19, l'HTLV mais aussi des virus comme le West Nile Virus.

- La centrifugation (figure 3)

Elle permet de séparer les composants du sang total en fonction de leur densité et de leur poids. Après la centrifugation, les globules rouges déleucocytés sont dans la partie inférieure de la poche et le plasma déleucocyté dans la partie supérieure.



**Figure 3 : Poches pliées puis mises en pot dans la centrifugeuse [7]**

- La séparation

La séparation physique des érythrocytes et du plasma se fait par action d'une presse automatique. L'automate séparateur (figure 4) permet d'obtenir un CGR et un plasma déleucocytés dans deux poches différentes.



**Figure 4 : Automate de séparation [7]**

Le plasma est ainsi transféré dans la troisième poche de recueil tandis que la quatrième poche contenant la solution de conservation est ajoutée au CGR. La poche contenant le CGR et le SAG-M sera ensuite homogénéisée par agitation douce. Les poches sont ensuite désolidarisées et les tubulures ressoudées, toujours dans des conditions stériles.

#### **b) Préparation du sang total prélevé sur un DMU à quintuple poches**

Les étapes de préparation sont les suivantes : centrifugation du sang total, séparation, filtration puis ajout de la solution de conservation. Ce dispositif permet le recueil de la couche leuco-plaquettaire.

##### ➤ Centrifugation

A l'issue de la centrifugation, les globules rouges seront au fond de la poche, le plasma dans la partie supérieure et la couche LP (*buffy-coat*) entre les érythrocytes et le plasma.

##### ➤ Séparation

L'automate-séparateur sépare le plasma, les globules rouges et la couche leuco-plaquettaire. Le plasma est migré vers le haut dans une deuxième poche. Il existe deux variantes pour la séparation des érythrocytes et de la couche leuco-plaquettaire : soit la couche est déviée dans une autre poche et le concentré érythrocytaire reste dans la poche initiale, soit le concentré érythrocytaire est décanté dans une autre poche et la couche leuco-plaquettaire reste dans la poche initiale (poche "*top and bottom*" qui permet de décanter vers le haut et vers le bas).

##### ➤ Filtration

La filtration est réalisée à l'issue de l'étape de séparation, grâce aux filtres intégrés pour le CGR et le plasma. Elle permet l'obtention d'un CGR et d'une unité de plasma déleucocytés ainsi qu'un concentré de plaquettes (non déleucocyté). La solution de conservation est ensuite ajoutée au CGR puis la poche sera homogénéisée par agitation douce. La couche leuco-plaquettaire est récupérée pour la préparation de mélange de concentrés de plaquettes standard et filtration ultérieure.

En attendant les résultats des analyses biologiques réalisées sur le don (décrites ci-après), les CGR sont stockés entre +2°C et +6°C, les plasmas à -25°C et les CP entre +20°C et +24°C (en attente de *poolage*).

Les étapes de la préparation des PSL depuis la réception des poches sont résumées dans schéma ci-dessous (figure 5) :

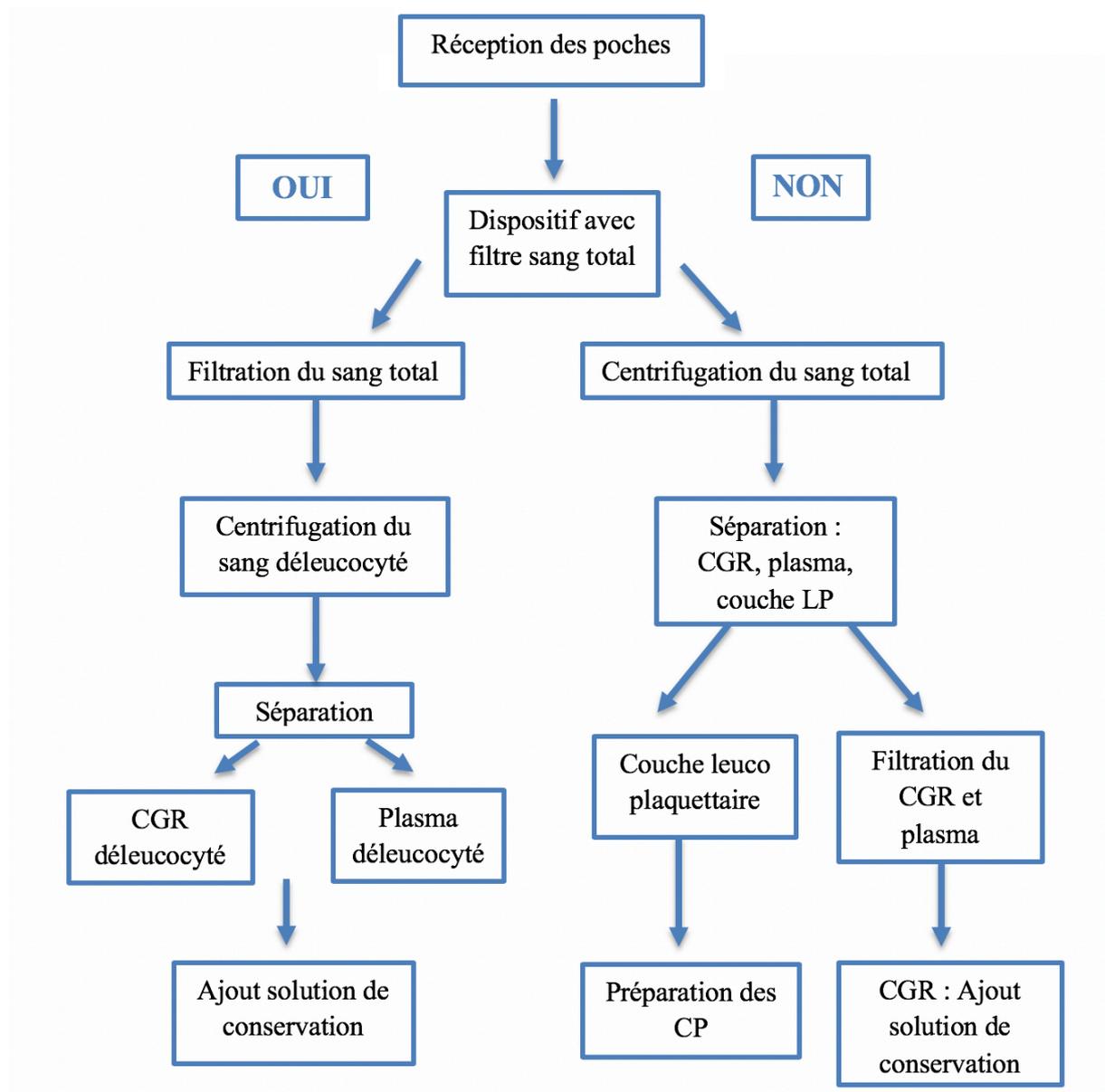


Figure 5: Résumé de la préparation des PSL

## 2. Transformations applicables aux PSL [3-9]

Une transformation est une opération facultative appliquée au PSL à la suite du processus de préparation initial. La transformation induit des modifications du produit tant en quantité (perte d'hémoglobine, de volume, de protéines plasmatiques) qu'en qualité (l'irradiation induit des lésions de stockage), ce qui peut entraîner une durée de conservation du PSL plus courte.

### a) Irradiation

L'irradiation est applicable aux CGR, aux CP (hors les CP inactivés par Amotosalen) ainsi qu'aux concentrés de granulocytes. Elle consiste à exposer le produit à une source de rayonnement ionisant de l'ordre de 25 à 45 Grays. Les lésions induites par rayonnement permettent de bloquer la prolifération des cellules nucléées telles que les lymphocytes et les cellules souches. L'irradiation est indiquée chez les sujets immunodéprimés (déficits congénitaux immunitaires, aplasie, allogreffe de moelle, greffe d'organe), chez les prématurés, lors de protocoles (transfusions fœtales, prélèvement de cellules souches hématopoïétique, don intra familial), dans le but de prévenir la réaction de greffon contre l'hôte post-transfusionnelle (GvH) en bloquant les lymphocytes T résiduels.

Le délai d'utilisation du PSL irradié doit être le plus court possible du fait des lésions induites, notamment à cause de la libération de potassium liée à l'hémolyse.

### b) Déplasmatisation

La déplasmatisation est applicable aux CGR et aux CP. Elle permet d'éliminer le plasma résiduel par plusieurs étapes de centrifugation (lavages successifs) et de le remplacer par une solution dépourvue de protéines plasmatiques (sérum physiologique par exemple).

L'objectif est de réduire au maximum la quantité de protéines plasmatiques résiduelles. La déplasmatisation s'accompagne d'une perte d'environ 10 % des globules rouges d'une unité de CGR ainsi qu'une diminution du rendement transfusionnel plaquettaire. Règlementairement, il doit rester moins de 0,5 de protéines extracellulaires, sans tenir compte de l'albumine.

Après déplasmatisation, le CGR peut être conservé 6 heures en cas de technique manuelle, 24 heures ou 10 jours en cas de technique automatisée et selon la technique utilisée. Les plaquettes peuvent être conservées 6 heures.

La déplasmatisation est recommandée dans les situations suivantes : antécédent de réactions transfusionnelles anaphylactiques majeures, patients porteurs d'un déficit en IgA et ayant des anticorps anti-IgA plasmatiques, effets indésirables transfusionnels de types allergiques répétés et empêchant la transfusion.

### c) Cryoconservation

La cryoconservation est applicable aux CGR, aux PFC et aux CP. Elle consiste à conserver un PSL à température négative en présence d'un cryoprotecteur (glycérol). Les CGR et CP peuvent être conservés de 2 à 10 ans selon la température utilisée (de -60°C à -196 °C). Cette transformation s'accompagne d'une perte d'au moins 10 % des globules rouges.

Les indications sont les CGR de groupe ou de phénotype rare, les patients ayant développé plusieurs anticorps d'intérêt transfusionnel, rendant la probabilité de compatibilité faible, les CP de phénotype HPA ou HLA rare.

#### **d) Réduction de volume**

La réduction de volume est applicable aux CP et parfois aux CGR. Elle permet d'éliminer une partie du milieu de conservation ou une partie du plasma résiduel du PSL (centrifugation puis expression du surnageant). Cette transformation permet de réduire le volume du produit. Réglementairement, l'hématocrite doit être supérieur à 70 % et la durée de conservation est réduite à 24 heures pour les CGR et à 6 heures pour les CP.

Les indications sont les patients nécessitant des restrictions d'apports volumiques, les nouveau-nés et prématurés de petit poids.

#### **e) Préparation pédiatrique**

La préparation pédiatrique est applicable aux CGR et aux CP. Elle permet la division aseptique du PSL en plusieurs unités. Le volume doit être au minimum de 50 mL.

Les indications sont les enfants de moins de 10 kilogrammes (faible volume sanguin) et les transfusions répétées de nouveau-nés ou enfants (transfusion du même PSL pour réduire le nombre de donneur).

#### **f) Sang total reconstitué à usage pédiatrique**

Cette transformation consiste à mélanger un CGR avec un PFC décongelé. La principale indication est l'exsanguinotransfusion du nouveau-né. La conservation après transformation du produit est de 6 heures.

#### **g) Mélange**

- Mélange de plasmas frais congelés sécurisés : consiste à mélanger après décongélation plusieurs unités de plasmas homologues de même groupe sanguin ABO

- Mélange de concentrés de plaquettes standards : pool de 2 à 5 concentrés plaquettaires de même groupe ABO

#### **h) Ajout de la solution de conservation**

Cette étape a déjà été décrite précédemment.

#### **i) Viro-atténuation**

Cette transformation est applicable aux CP et aux PFC. L'Amotosalen est un psoralène synthétique qui s'intercale de façon réversible entre les régions hélicoïdales de l'ADN et de l'ARN des agents microbiens. Le plasma déleucocyté est mis en contact avec une solution d'Amotosalen puis est illuminé par les ultraviolets A (300-500 nm) afin d'assurer une liaison covalente (irréversible) avec l'ADN/ARN microbien. La réplication des agents pathogènes est ainsi boquée. L'Amotosalen résiduel est ensuite éliminé par une adsorption spécifique. L'inactivation par Amotosalen est efficace sur les virus nus et enveloppés, les bactéries, les parasites et les leucocytes.

### 3. Qualification [3-9]

La qualification biologique consiste soit à affecter une spécificité complémentaire au PSL, soit à sélectionner le PSL le plus adéquat possible pour le receveur.

#### a) Phénotypé

Il est obligatoire de déterminer les antigènes ABO et RH 1 (D) de chaque PSL.

Pour les CGR, la qualification « phénotypé » signifie qu'en plus des antigènes ABO et RH 1, cinq autres antigènes ont été déterminés, à savoir RH 2, 3, 4, 5 (C, E, c, e) et KEL 1 (K).

Les indications sont les suivantes :

- Antécédent d'agglutinines irrégulières ou recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) positive
- Nouveau-nés dans un contexte d'allo-immunisation fœto-maternelle
- Femmes de la naissance jusqu'à la fin de la période de procréation

En dehors de ces indications, la qualification « phénotypé » est recommandée chez toute personne ayant une espérance de vie raisonnable et lors de transfusions itératives.

Pour les CP, la qualification « phénotypé » signifie qu'en plus des antigènes ABO et RH 1, les antigènes HLA (classe I) et/ou HPA (1 à 5) ont été déterminés. Les indications sont l'allo-immunisation contre des antigènes des systèmes HLA de classe I ou HPA (système d'antigènes plaquettaires).

#### b) Phénotype étendu

Consiste à déterminer au moins un des antigènes d'un système autre que ceux des systèmes ABO, Rhésus (RH 1 à 5) et Kell (KEL 1), à savoir les antigènes des systèmes Duffy, Kidd, Lewis, MNS. Le phénotypage étendu est applicable aux CGR.

Les indications regroupent :

- Antécédent de RAI positive ou RAI positive contre un de ces antigènes
- En cas d'allo immunisation érythrocytaire complexe

#### c) Compatibilisé

L'épreuve de compatibilité au laboratoire consiste à mélanger le plasma du patient avec un échantillon représentatif du concentré de globules rouges que l'on souhaite lui transfuser.

Les indications reconnues de l'épreuve de compatibilité sont les suivantes :

- En cas de transfusion chez un patient ayant une RAI positive ou un antécédent de RAI positive.
- En cas de transfusion de nouveau-né (contexte d'allo immunisation fœto-maternelle) : le CGR doit être compatibilisé avec le plasma de la mère.
- Recommandé en cas de transfusion de patient atteint de drépanocytose.

#### 4. Qualification biologique : analyses obligatoires et facultatives [3-9, 15]

Les analyses biologiques et tests de dépistages sont réglementés par l'article *D1221-6* du Code de la Santé Publique.

La qualification biologique permet de sécuriser la transfusion au niveau immuno-hématologique mais aussi d'un point de vue infectieux. En cas d'anomalie biologique, la poche est écartée, ce qui représente environ 2% des poches chaque année.

##### a) Les analyses obligatoires

Sur chaque don de sang destiné à la préparation de PSL à usage thérapeutique direct, les analyses suivantes sont effectuées :

- Examens immuno-hématologiques
  - Détermination des groupes sanguins érythrocytaires
    - Groupage ABO et RH1 (D)
    - Lors des deux premiers dons, détermination du phénotype RH 2, 3, 4, 5 et KEL 1 (C, E, c, e et K).
  - Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires pouvant avoir une incidence clinique transfusionnelle
  - Recherche d'anticorps anti-A et anti-B immuns
  - Le dosage de l'hémoglobine et de l'hématocrite
- Dépistage de maladies transmissibles
  - Sérologie de la syphilis
  - Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) : détection des anticorps anti VIH1 et VIH2, détection génomique virale (DGV) VIH-1.
  - Virus de l'hépatite B (VHB) : détection de l'antigène HBs, des anticorps anti HBc et détection génomique virale.
  - Virus de l'hépatite C (VHC) : détection des anticorps anti VHC et détection génomique virale.
  - Human T-Lymphotropic Virus (HTLV) : détection des anticorps anti HTLV I et II pour les primo-donneurs et dans les départements de la Guadeloupe et de la Martinique.

- Evolution des mesures systématiques de dépistage (tableau II)

**Tableau II: Évolution du dépistage biologique du don**

<b>Année d'instauration</b>	<b>Dépistage</b>
1947	Syphilis (anticorps)
1971	VHB (antigène HBs)
1985	VIH (anticorps anti-VIH-1)
1988	- VHB (anticorps anti-HBc) - Dosage ALAT (supprimé en 2003)
1989	VIH (anticorps anti-VIH-1 et 2)
1990	VHC (anticorps anti-VHC)
1991	HTLV (anticorps anti-HTLV-I et II)
2001	DGV VIH 1 et VHC
2010	DGV VHB

Afin d'assurer la sécurité infectieuse du don, d'autres mesures ont été prises comme l'exclusion des donneurs ayant été transfusés à partir de 1997 (prévention de la contamination par un agent transmissible non dépisté), la déleucocytation systématique des PSL à partir de 1998 et l'exclusion des donneurs ayant séjournés plus de 12 mois cumulés dans les îles britanniques entre 1980 et 1996 (prévention du variant de la maladie de Creutzfeld-Jakob), à partir de 2000.

**b) Les analyses effectuées en fonction du contexte épidémiologique ou clinique**

- Dépistage des anticorps anti-Cytomégalovirus (CMV).
- Dépistage d'anticorps anti paludéens chez les donneurs ayant séjourné dans une zone d'endémie palustre depuis plus de quatre mois et moins de trois ans après le retour (dépistage instauré depuis 1986).
- Dépistage d'anticorps antichagasiques (*Trypanosoma cruzi*, instauré en 2007), de la Dengue, du Chikungunya, du West Nile Virus...

## 5. Caractéristiques des CGR [3-10, 14, 15]

Les obligations réglementaires sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau III) :

**Tableau III: Caractéristiques réglementaires des CGR d'après [4]**

<b>Hématocrite (%)</b>	50-70
<b>Taux d'hémolyse* à la fin du stockage</b>	<0,8% de la quantité d'hémoglobine totale
<b>Hémoglobine (g)</b>	≥ 40
<b>Volume</b>	Pas de limite inférieure. Volume mentionné sur l'étiquette
<b>Contenu en leucocytes</b>	<1 million de leucocytes/ unité de CGR
<b>Durée et mode de conservation</b>	- 42 jours entre +2°C et +6°C - En cas d'ouverture intentionnelle de la poche (lors de la préparation ou pendant la conservation) : maximum 24 heures

\*Taux d'hémolyse à la fin du stockage :

L'hémolyse est mesurée à la fin du stockage des CGR par échantillonnage. Il n'existe actuellement aucun consensus quant à la méthode utilisée pour mesurer l'hémolyse.

Elle est déterminée à partir de trois paramètres : l'hémoglobine totale, l'hématocrite et l'hémoglobine libre du surnageant.

L'hémoglobine totale et l'hématocrite sont mesurés par des automates classiques d'hématologie [16].

L'hémoglobine libre du surnageant peut être mesurée par spectrophotométrie (automate lecteur rapide comme l'HemoCue®, lecture spectrophotométrique 540 nm), après centrifugation de l'échantillon [6, 17].

L'hémolyse rendue en pourcentage peut être calculée selon la formule suivante :

$$(\text{Hémoglobine libre} / \text{Hémoglobine totale}) \times (100 - \text{Hématocrite})$$

D'autres anciennes méthodes sont décrites dans la littérature, cette fois en ne prenant pas en compte l'hématocrite :

$$\text{Hémolyse (\%)} = (\text{absorbance}_{\text{surnageant}} / \text{absorbance}_{\text{CGR}}) \times 100 \text{ [18]}$$

Les automates d'hématologie influencent les résultats d'hématocrite, de plus le dosage de l'hémoglobine libre dans les CGR n'est pas standardisé. Il serait donc intéressant d'homogénéiser la méthode de détermination de l'hémolyse [19].

Les qualifications et transformations applicables aux CGR sont résumées dans le tableau ci-dessous (tableau IV) :

**Tableau IV: Qualifications et transformations applicables aux CGR d'après [4]**

<b>Qualifications</b>	Phénotypé
	Compatibilisé
<b>Transformations</b>	Solution de conservation
	Irradiation
	Déplasmatisation
	Cryoconservation
	Préparation pédiatrique
	Réduction de volume

### III. Distribution et délivrance [2]

Une fois la préparation et la qualification biologique terminée, les PSL sont aptes à être cédés. Ils sont destinés soit à un établissement de santé dans le cadre d'une prescription médicale pour un patient donné (80% des cas), soit à la « distribution-dépôt » (20% des cas), c'est-à-dire que l'établissement de santé gère lui-même ses stocks de son dépôt. Trois niveaux d'urgence transfusionnelle sont définis selon les recommandations de l'AFSSAPS de 2002.

L'urgence vitale immédiate (UVI), l'obtention des PSL doit être la plus rapide possible, la délivrance doit être sans délai. L'urgence vitale (UV), dans ce cas l'obtention des PSL doit être inférieure à 30 minutes. Et l'urgence relative (UR), le délai d'obtention doit être de 2 à 3 heures.

## **PARTIE II : LESIONS DE STOCKAGE DES CONCENTRES DE GLOBULES ROUGES**

En France, les CGR sont stockés à  $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$  dans des poches contenant une solution de conservation (SAG-M) pendant au maximum 42 jours. Le stockage à  $+4^{\circ}\text{C}$  permet de ralentir le métabolisme des globules rouges afin d'éviter un vieillissement trop rapide. En effet, le métabolisme est dix fois plus lent à  $+4^{\circ}\text{C}$  qu'à température ambiante. La solution de conservation des CGR permet de maintenir le métabolisme à un niveau minimum permettant la production nécessaire d'ATP et de 2-3 DPG, ceci dans le but de maintenir la fonctionnalité et la viabilité des CGR. Malgré cela, l'altération des globules rouges est inévitable. Ils vont subir à la fois le vieillissement normal mais vont en plus subir des lésions liées au stockage, ce sont les lésions dites de « stockage » [20-23].

## **I. Lésions de stockage**

Un globule rouge a une durée de vie d'environ 120 jours et peut être éliminé par deux mécanismes, l'hémolyse extravasculaire qui est majoritaire et l'hémolyse intravasculaire [24, 25].

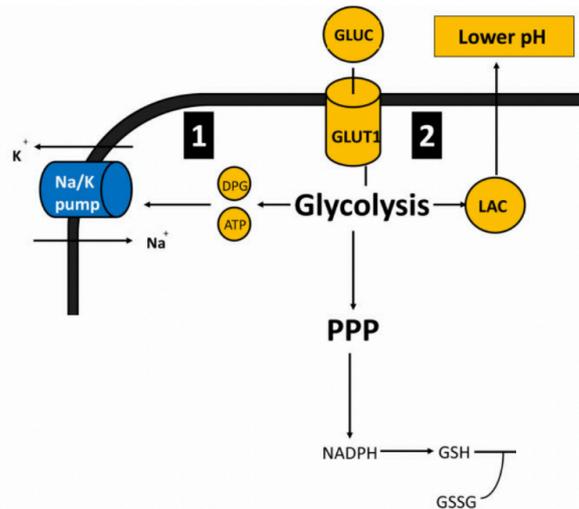
Au cours du stockage, les érythrocytes vont subir *in vitro* des lésions dites de stockage. Elles peuvent s'expliquer par trois mécanismes principaux, tous reliés les uns aux autres : l'altération métabolique des globules rouges, le stress oxydant ainsi que les dommages membranaires provoquant des modifications à la fois métaboliques, fonctionnelles, morphologiques et rhéologiques des érythrocytes. Les lésions apparaissent progressivement dès les premiers jours de stockage et s'accumulent rapidement à partir de la deuxième semaine. On différencie les lésions réversibles et les lésions irréversibles.

Pour décrire les lésions de stockage, nous allons les séparer en trois parties, à savoir l'altération du métabolisme érythrocytaire, le stress oxydatif et les modifications morphologiques.

### **1. Altération du métabolisme érythrocytaire**

#### **a) La glycolyse et l'acidose [20-23, 26, 37, 28-31]**

*In vivo*, la majeure partie du glucose est métabolisée par glycolyse anaérobie [20, 26]. L'autre voie utilisée étant la glycolyse aérobie (environ 10% du glucose est métabolisé par cette voie) [24]. Pour rappel, la glycolyse (figure 6) permet de transformer du glucose en deux trioses phosphates et produit de l'ATP, du NADH réduit, du NADPH, du 2-3 DPG, des protons et du lactate.



**Figure 6: Glycolyse au cours du stockage [20]**

*In vitro*, le besoin métabolique des CGR est principalement régulé par la glycolyse anaérobie, elle est donc leur principale source d'énergie lors du stockage.

La faible température de stockage ralentit la glycolyse, elle est environ dix fois plus lente à +4°C qu'à température ambiante. Le pourcentage de glycolyse (et de production d'ATP) diminue de 10 à 15% par degré Celsius. La solution de conservation SAG-M permet de maintenir une glycolyse suffisante pour la viabilité des CGR.

Au cours des cinq à six semaines de stockage, 6 à 8 mEq de protons sont produits par la glycolyse. La concentration érythrocytaire de lactate est augmentée dès les premières heures et cette augmentation va se poursuivre tout au long du stockage. Le lactate ainsi que les protons libérés provoquent une acidification du pH de la solution de conservation et du pH intra-érythrocytaire.

Le pH du sang veineux d'un donneur sain est aux alentours de 7,35. Le pH initial de la solution de conservation des CGR est aux alentours de 7,0. A un pH inférieur à 7,2-7,3, l'enzyme qui dégrade le 2-3 DPG (la bisphosphoglycerate phosphatase) est active, provoquant la dégradation de 2-3 DPG avec en parallèle un burst initial d'ATP. A la fin du stockage, le pH baisse aux alentours de  $6,55 \pm 0,05$ .

L'acidose du milieu de conservation provoque un rétrocontrôle négatif sur la glycolyse en inhibant plusieurs enzymes de la glycolyse. Moins d'ATP est produit, ce qui ralentit la glycolyse puisque l'initiation de la glycolyse requiert deux molécules d'ATP.

Au cours de la première semaine de stockage, l'activité de la glycolyse augmente grâce à un burst d'ATP puis va diminuer rapidement à partir de la deuxième semaine de stockage.

### **b) L'ATP [30, 37, 41]**

*In vitro*, l'ATP est considérée comme étant le reflet de la « réserve énergétique » des globules rouges. En effet, la concentration d'ATP à la fin du stockage serait corrélée à la recirculation des érythrocytes *in vivo* 24 heures après la transfusion.

L'ATP diminue au cours du stockage, passant de  $4 \pm 1 \mu\text{M/g}$  d'hémoglobine au premier jour de stockage à  $1-3 \mu\text{M/g}$  d'hémoglobine après six semaines de stockage. Les conséquences de la diminution en ATP sont :

- Métaboliques : ralentissement du métabolisme érythrocytaire et des réactions ATP dépendantes (notamment la glycolyse, les transports actifs sodium/potassium, les réactions anti-oxydantes...)
- Morphologiques et rhéologiques : associée à l'acidification du milieu de conservation, elle provoque des changements morphologiques (perte de la forme discoïde) et altère l'intégrité membranaire avec une déformabilité réduite et une fragilité osmotique augmentée.

### **c) Pompe sodium-potassium [21, 22, 29, 32, 33]**

La pompe sodium-potassium ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) est une protéine transmembranaire, ATP dépendante qui permet l'échange par transport actif de sodium intracellulaire contre du potassium extracellulaire. *In vivo*, elle permet de maintenir des concentrations intracellulaires de potassium et de sodium aux alentours de 90 mM et 5mM respectivement, et des concentrations extracellulaires de potassium et de sodium aux alentours de 5mM et 140 mM respectivement. Comme toute enzyme, son activité est dépendante de la température mais elle est également dépendante de l'ATP : toute diminution d'ATP est responsable d'une diminution d'activité de la pompe. Ainsi, du fait des faibles températures de stockage des CGR et de la diminution progressive des CGR en ATP, la pompe va avoir une activité diminuée.

Cela va se traduire par une accumulation de sodium intra érythrocytaire et une fuite extracellulaire de potassium. La concentration initiale en potassium dans le surnageant est d'environ 4 mM, elle augmente de 1 mEq/L chaque jour, avec une forte augmentation dès le début de stockage. Elle peut atteindre une concentration aux alentours de 50 mM au bout de 42 jours. Quant à la concentration de sodium extracellulaire, elle passe de 140 mM à 100 mM. Après six semaines de stockage, la concentration intracellulaire de potassium diminue de 40%, celle de sodium augmente de 300%. A noter que la concentration de sodium intra érythrocytaire joue un rôle sur le volume et la forme du globule rouge. L'augmentation de la concentration sodique intracellulaire s'accompagne d'absorption d'eau, ce qui provoque l'augmentation du Volume Globulaire Moyen (VGM) après trois semaines de stockage.

L'accumulation de potassium dans le surnageant est principalement attribuable à l'altération de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  mais elle peut être également attribuée (en moindre importance) à l'hémolyse progressive des globules rouges, qui libèrent alors le potassium dans le milieu extracellulaire.

D'autres pompes sont touchées par la baisse en ATP dont la pompe calcique, ce qui provoque une accumulation intracellulaire de calcium et l'ouverture du canal calcium-potassium. Le flux entrant de calcium conduit à l'érythroptose *via* l'activation de calpaïnes.

#### d) 2-3 DPG [29, 30, 33, 34]

Le 2-3 DPG régule l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. La basse température de stockage ainsi que la diminution de pH provoquent l'augmentation de sa dégradation. Sa concentration devient indétectable dès les deux premières semaines de stockage, elle passe de 4 à 0 mmol/L en deux semaines. Après 42 jours de stockage, la concentration peut diminuer de 90% mais se normalise dans les 72 heures après la transfusion.

On observe ainsi une augmentation de l'affinité de l'oxygène de l'hémoglobine. *In vitro* la libération d'oxygène par l'érythrocyte est inversement proportionnelle à la teneur corpusculaire en 2-3 DPG.

## 2. Stress oxydant [20]

Le stockage des CGR s'accompagne d'une diminution des défenses anti-oxydantes et d'une augmentation des attaques oxydatives avec la formation de *Reactive Oxygen Species* (ROS), avec un pic de production dès les deux premières semaines de stockage. [21, 35- 40].

*In vivo*, une faible quantité d'oxyhémoglobine subit une oxydation spontanée, générant de la méthémoglobine et des ROS. La méthémoglobine formée est instable, se dénature jusqu'à la formation d'hème.

L'hème et les ROS (notamment les radicaux hydroxyles) peuvent causer des blessures oxydatives aux lipides et protéines membranaires. Les globules rouges sont normalement protégés de ces attaques par la présence d'antioxydants qui neutralisent les ROS, comme la NADH-réductase (réduit la méthémoglobine en déoxyhémoglobine) ou encore le glutathion.

Ces mécanismes de protection sont altérés pendant le stockage. L'oxydation spontanée de l'hémoglobine augmente du fait des conditions d'acidose. Les concentrations d'antioxydants diminuent au cours du stockage, exposant les globules rouges à un plus grand stress oxydant. Ce stress oxydant est un facteur prédominant des dommages membranaires du globule rouge.

Le stress oxydatif provoque : la fragmentation de protéines structurales telles que la spectrine, l'ankyrine ou encore la protéine AE1 (ou protéine Bande 3) ; la carbonylation des protéines membranaires et cytosoliques mais aussi une peroxydation lipidique. Il est de ce fait responsable de dommages membranaires et structurels érythrocytaires.

## 3. Modifications morphologiques et structurelles [20, 21, 41- 44]

La fonctionnalité et la viabilité des érythrocytes sont dépendantes de l'intégrité membranaire. Au cours du stockage, les globules rouges vont subir de nombreuses altérations morphologiques. L'anomalie majeure est la perte de la biconcavité avec libération de microvésicules tandis qu'au niveau structurel, l'anomalie principale est l'altération de l'intégrité

membranaire avec modification de la composition membranaire. Ces anomalies sont maintenant bien connues, notamment grâce à la microscopie électronique et à la cytométrie en flux.

Les atteintes morphologiques sont principalement dues à l'altération du métabolisme énergétique (diminution en ATP, acidose, augmentation de la concentration en calcium) ainsi qu'au stress oxydant (attaques oxydatives des protéines structurales). Elles affectent les propriétés rhéologiques du globule rouge qui se traduisent par une déformabilité réduite, une fragilité osmotique et une fragilité mécanique augmentée.

#### **a) Morphologie [21, 23 32, 33, 41, 43, 45-56]**

Rappelons que le globule rouge est une cellule anucléée en forme de disque biconcave de 7 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre. Une de ses caractéristiques propres est sa déformabilité lui permettant d'entrer dans les capillaires (3-8  $\mu\text{m}$  de diamètre).

La membrane du globule rouge est une bicouche phospholipidique, principalement formée de protéines (50%), de lipides (42%) et de glucides (8%). Les lipides sont composés de phospholipides (65%), de cholestérol (23%) et d'acides gras (12%).

La double couche phospholipidique est formée d'un feuillet externe et d'un feuillet interne

- Le feuillet externe est composé principalement de phospholipides (PL), de phosphatidylcholine et de sphingomyéline.
- Le feuillet interne est composé principalement de phosphatidylsérine (PS) et d'aminophospholipides. Lorsque la PS est présente sur la face externe, elle envoie un signal de sénescence pour les macrophages du système réticulo-endothélial et aurait également un rôle thrombogénique.

Les phospholipides ont une distribution asymétrique au niveau de la bicouche, on parle de « trans-asymétrie ». Cette asymétrie est principalement maintenue par des aminophospholipides translocases (flippase, floppase, scramblase) mais aussi par les interactions entre les PL et le cytosquelette.

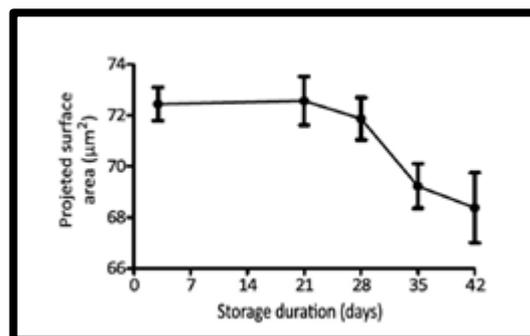
Les principales protéines membranaires sont les suivantes :

- Protéine AE1 (bande 3) : protéine transmembranaire. C'est la protéine de membrane la plus abondante, à raison de  $10^6$  copies par cellule. Elle régule les échanges de chlore et de bicarbonate à travers la membrane (échange de bicarbonate cellulaire contre du chlore plasmatique) et permet le maintien de l'organisation protéique de la membrane. Cette protéine est également impliquée dans le signal de sénescence des globules rouges en générant des néoantigènes, ce qui provoque la formation d'auto-anticorps. Ces auto-anticorps permettent ensuite une clairance rapide des érythrocytes sénescents par l'action des macrophages.
- Protéines structurelles du cytosquelette : spectrine, ankyrine.

*In vivo*, le globule rouge peut perdre des fragments membranaires dans plusieurs situations :

- Lors du processus de maturation : maturation des érythroblastes en réticulocytes (perte de 10% de la surface membranaire), maturation du réticulocyte (140 fL) en érythrocyte mature (90 fL). Un globule rouge perd environ 16% de sa membrane lors de sa vie.
- Lors du processus de mort cellulaire (processus normal). Le vieillissement de l'érythrocyte s'accompagne d'une perte de surface et d'hémoglobine ainsi qu'un gain de densité.
- Lors de la formation de vésicules. Un globule rouge émet environ 230 vésicules (allant de 50 à 200 nm) au cours de sa vie, qui sont rapidement éliminés par phagocytose. Ce processus serait un moyen d'éliminer des composants délétères comme les lipides et protéines oxydés. Physiologiquement, les érythrocytes perdent environ 20% de leur hémoglobine par vésiculation au cours de leur vie.

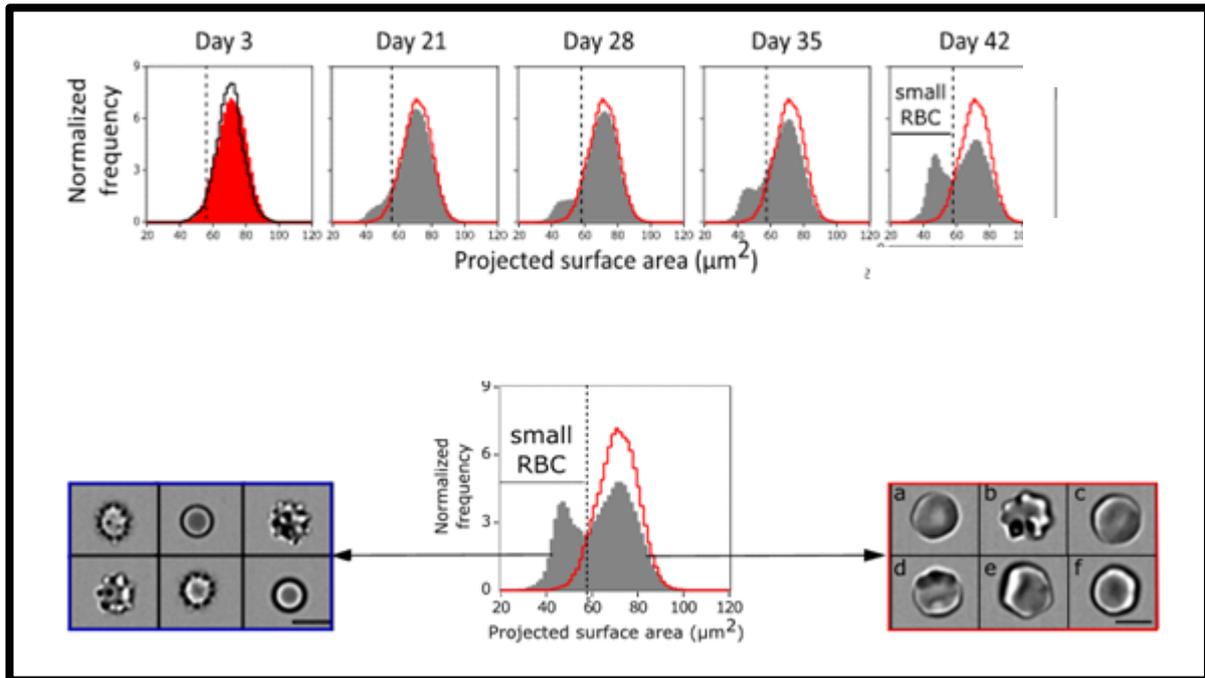
Au cours du stockage, le globule rouge va devenir de plus en plus dense. Tandis que l'érythrocyte augmente de volume, il va également diminuer en surface avec une valeur moyenne initiale de 72  $\mu\text{m}^2$  à J3, contre 68  $\mu\text{m}^2$  à la fin du stockage (figure 7).



**Figure 7 : Evolution de la surface des globules rouges au cours du stockage [45]**

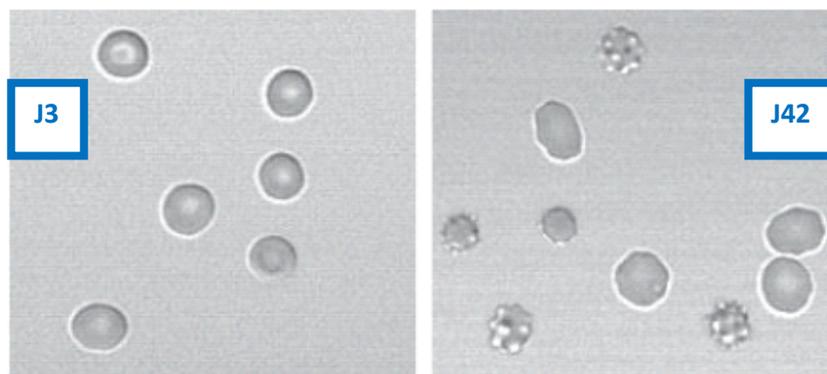
L'augmentation de volume et la diminution de surface du globule rouge s'expliquent par l'apparition progressive d'une deuxième population : les érythrocytes biconcaves vont laisser place à une population plus rigide, moins déformable et avec une tendance à l'agrégabilité et d'adhésivité à l'endothélium. Il s'agit des échinocytes, des sphérocytes et des sphéro-échinocytes (figures 8 et 9). Le ratio surface/volume se retrouve ainsi diminué, facteur qui joue un rôle majeur dans la fragilité osmotique des globules rouges. En effet, un ratio diminué se traduit par une fragilité osmotique augmentée. La fragilité osmotique des CGR au cours du stockage sera détaillée dans une partie dédiée.

Les érythrocytes sont plus denses du fait de l'émission de vésicules à leur surface pauvres en hémoglobine [17].



**Figure 8 : Evolution de la surface des érythrocytes au cours du stockage [45]**

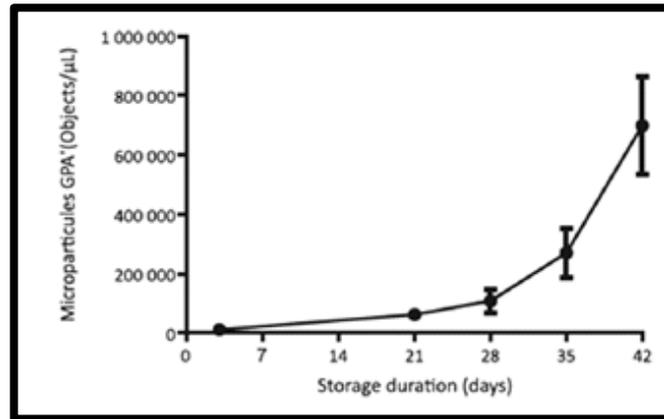
A gauche, la population est constituée de sphérocytes, de sphéro-échinocytes et d'échinocytes. A droite, la population est constituée d'érythrocytes biconcaves, de discocytes et d'échinocytes.



**Figure 9 : Morphologie des GR à J3 et J42 [41]**

A gauche (J3), les érythrocytes sont biconcaves. A droite (J42), on observe l'apparition d'échinocytes et de sphéroéchinocytes.

Les échinocytes possèdent des projections membranaires à leur surface, des spicules qui vont progressivement être libérés dans le surnageant des CGR, participant ainsi à la formation de micro-vésicules (MV, également appelées microparticules). L'apparition des microvésicules est progressive, avec une accumulation exponentielle pendant le stockage. Elle devient significative à partir de la deuxième semaine (figure 10).



**Figure 10 : Accumulation des microparticules au cours du stockage [56]**

Le terme micro-vésicules regroupe les MV de grande taille (200-1200 nm), les exosomes (30-150 nm) et les corps apoptotiques (50-500 nm). D'une façon générale, les microvésicules retrouvées dans le sang de sujets sains proviennent des globules rouges, des plaquettes, des leucocytes et des cellules endothéliales. L'origine des MV peut être déterminée par un marqueur de surface spécifique de leur cellule parentale, par exemple la glycophorine A pour les globules rouges. Elles proviennent soit de l'activation, soit de l'apoptose de leur cellule d'origine.

Dans le cas des CGR, les MV retrouvées dans le surnageant proviennent uniquement des érythrocytes étant donné le faible taux résiduel de leucocytes et de plaquettes dans une unité de CGR. Ce sont de petits morceaux dérivés de la membrane érythrocytaire d'environ 150 nm. La composition des MV est proche de celle de la bicouche lipidique des globules rouges. Elles contiennent également de l'hémoglobine qui peut réagir avec le nitrite d'oxyde (NO).

Les anomalies morphologiques sont visibles à partir de la première semaine de stockage, deviennent importantes à partir de la deuxième semaine et sont irréversibles à partir de la quatrième semaine de stockage.

#### **b) Composition membranaire [42-44]**

Les principales modifications touchant la composition membranaire sont une perte d'asymétrie des PL de la bicouche lipidique, avec une perte de lipides membranaires ainsi que l'externalisation de la PS.

La distribution asymétrique des PL de la bicouche est maintenue par une enzyme, la translocase, qui va être perturbée par le stockage froid des CGR. La redistribution des aminophospholipides se trouve ainsi diminuée, conduisant à la perte d'asymétrie des PL ainsi qu'au phénomène de vésiculation des globules rouges.

Un autre changement significatif est la perte de lipides membranaires du feuillet interne et du feuillet externe. La proportion de cholestérol augmente, le ratio CL/PL est altéré, ratio qui est un déterminant majeur dans la fluidité de la membrane, provoquant une augmentation de la viscosité et une diminution de la déformabilité.

#### 4. Hémolyse

Au cours du stockage, l'hémolyse augmente progressivement : l'hémoglobine libre dans le surnageant va voir sa concentration multipliée par huit après six semaines. Pour être considéré conforme à la délivrance, l'hémolyse du CGR doit être inférieure à 0,8% à la fin du stockage (HAS, directive européenne 2004/33/CE).

## II. Réversibilité des lésions [20, 41, 57-60]

La réversibilité des changements est inversement proportionnelle à la durée de stockage. Globalement, la littérature s'accorde à définir les lésions précoces comme celles apparaissant au cours des deux premières semaines de stockage et les lésions tardives comme celles apparaissant dans les quatre semaines et plus. Contrairement aux lésions tardives, les lésions précoces sont généralement réversibles.

Blasi s'est basé sur la classification de Berezina et Bessis pour classer les anomalies morphologiques réversibles et irréversibles lors du stockage. Les changements morphologiques réversibles regroupent les échinocytes (de type I et II) et les stomatocytes. Les changements irréversibles regroupent les échinocytes de type III, les sphéro-échinocytes, les sphéro-stomatocytes et les ovalocytes.

Les modifications irréversibles au niveau morphologique sont la perte membranaire avec libération de micro-vésicules et l'hémolyse. Elles induisent un ratio S/V diminué donc une fragilité osmotique augmentée qui sera irréversible.

L'échinocyte de type I est caractérisé par un faible nombre de spicules à sa surface. Il évolue en type II puis en type III en ayant un plus grand nombre de spicules et un ratio surface/volume diminué (figures 11 et 12).

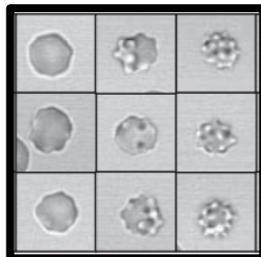


Figure 11 : Les différents stades de l'échinocyte [45]

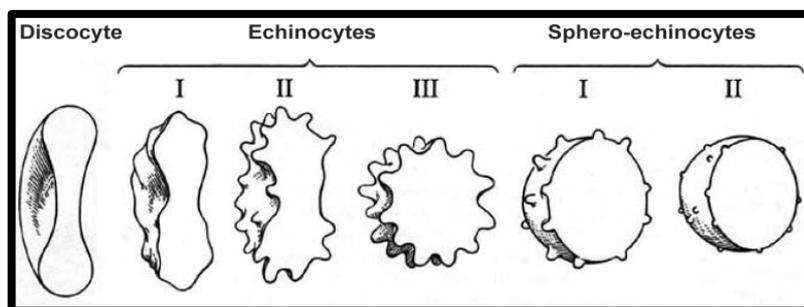


Figure 12 : Evolution du discocyte en échinocyte [61]

Les autres lésions de stockage réversibles sont celles touchant le métabolisme car après la transfusion, le métabolisme érythrocytaire reprend son activité.

### III. Cas particulier de la fragilité osmotique des CGR au cours du stockage

Les lésions de stockage des CGR regroupent une multitude d'altérations notamment une plus grande fragilité osmotique, traduisant une perte de surface membranaire et un gain de volume. Le but de nos manipulations est d'étudier les lésions de stockage des CGR en mesurant la fragilité osmotique par l'appareil semi-automatique Osmocells® (SD Innovation, Frouard).

Nous allons donc comparer la fragilité osmotique de 9 CGR à différents temps de stockage, à savoir le premier jour (J1), le vingtième jour (J20) et le quarantième jour (J40) afin de voir si nous observons une modification de la fragilité osmotique au cours du stockage. Des tubes EDTA prélevés en parallèle le jour du don nous permettra d'évaluer l'impact éventuel du processus de préparation des CGR, en comparant la fragilité osmotique des CGR à J1 à celle des tubes à J0.

Nous allons tout d'abord faire des rappels sur la fragilité osmotique des érythrocytes puis dans un second temps nous présenterons l'historique des tests de fragilité osmotique (TFO). Pour finir, nous ferons une revue de la littérature sur la fragilité osmotique des CGR au cours du stockage.

#### 1. Erythrocytes et fragilité osmotique [62, 63]

Physiologiquement, les globules rouges sont à l'équilibre en solution isotonique, c'est-à-dire en présence d'une solution ayant la même osmolarité que le plasma, soit 290 à 310 mOsm/L. Nous pouvons citer comme exemple de solution isotonique le sérum physiologique, de concentration en chlorure de sodium (NaCl) égale à 9 g/L. Lorsque l'osmolarité diminue, la pression osmotique est modifiée, l'érythrocyte va alors se remplir d'eau afin de réguler l'équilibre osmotique. Le globule rouge va gonfler jusqu'à atteindre un volume critique, le volume hémolytique. Lorsque ce volume est atteint, l'érythrocyte ne peut plus se déformer davantage et va hémolyser.

*In vitro*, le principe du test de fragilité osmotique (TFO) est de soumettre les globules rouges à un stress osmotique, c'est-à-dire à des concentrations salines décroissantes et de mesurer l'hémolyse. Le pourcentage d'hémolyse est alors représenté en fonction de la concentration de NaCl. Une fragilité osmotique augmentée se traduira par une hémolyse à des concentrations en chlorure de sodium plus élevées ou peu hypotonique.

Dans la littérature, plusieurs techniques ont été décrites pour étudier la fragilité osmotique des globules rouges. Nous distinguons deux types de méthodes, les anciennes méthodes dites « conventionnelles » qui provoquent une hémolyse brutale et les « nouvelles » méthodes qui provoquent une hémolyse douce. Les anciennes techniques sont lentes, laborieuses, manquent de précision et ne sont pas standardisées, tandis que les méthodes plus récentes sont mieux standardisées et plus précises.

### a) Hémolyse brutale

Dès les années 1880, Chanel (1880) [74], Hamburger (1883) [75] et Vaughan (1937) [76] ont utilisé le même principe décrit ci-dessus pour étudier la fragilité osmotique des globules rouges. Plusieurs dilutions de chlorure de sodium décroissantes (gamme de concentration allant de 0,1 à 0,9%) sont mélangées avec un échantillon de sang. Le pourcentage d'hémolyse est ensuite apprécié visuellement et permet d'obtenir des courbes de fragilité érythrocytaire. Ces courbes représentent le pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration de chlorure de sodium. Le degré de résistance des érythrocytes face à l'hypotonie de leur environnement est utilisé expérimentalement pour mesurer la viabilité des globules rouges, mais aussi à des fins diagnostiques (sphérocytose héréditaire par exemple).

Guest [77] décrit que les globules rouges de patients sains peuvent gonfler jusqu'à 175 fois leur volume initial tandis que les patients atteints de sphérocytose héréditaire gonflent jusqu'à 150 fois leur volume. Les patients atteints de sphérocytose héréditaire hémolysent à des concentrations supérieures en chlorure de sodium par rapport aux sujets sains, ce qui montre que les sphérocytes sont plus fragiles (figure 13).

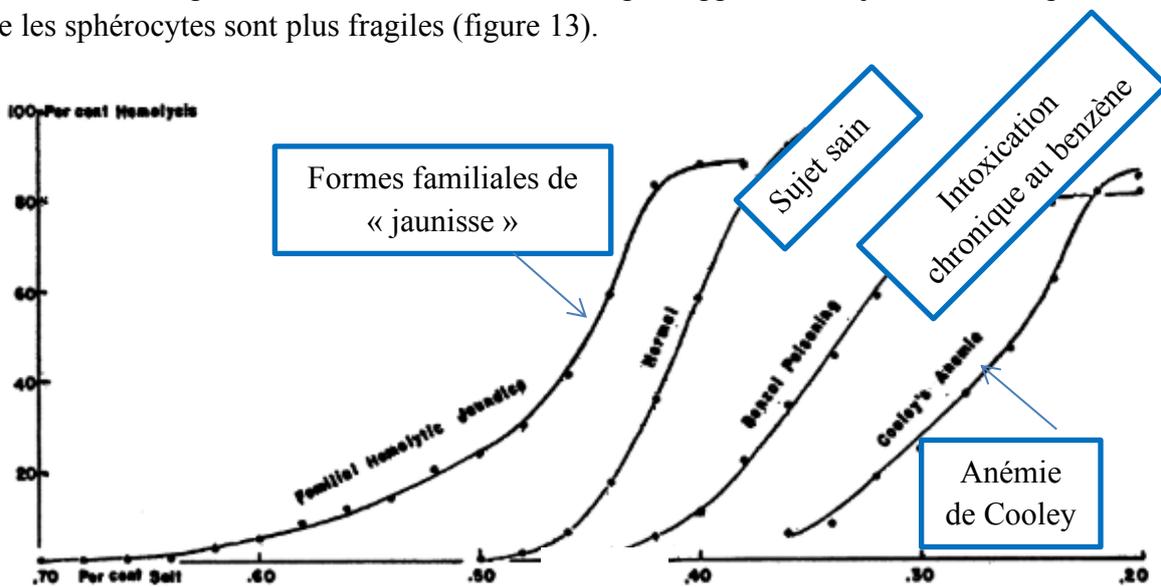


FIG. 1. PER CENT HEMOLYSIS PLOTTED AGAINST STRENGTH OF SALT SOLUTION

### Figure 13 : Courbes d'hémolyse des érythrocytes [78]

En 1940, Hunter [78] met en avant la nécessité de mettre en place une technique rapide, simple et standardisée car les courbes d'hémolyse ne sont pas assez précises (méthodes semi-quantitatives, hémolyse déterminée visuellement, les facteurs influençant le degré d'hémolyse tels que la température, le pH, l'anticoagulant utilisé ne sont pas maîtrisés). Les premières améliorations significatives apparaissent progressivement, notamment avec l'utilisation de méthodes de photoélectriques pour déterminer l'hémolyse.

Par la suite, Parpart [79] décrit en 1947 une méthode qui utilise une solution saline identique à celle de Dacie : une solution de NaCl-PO<sub>4</sub> de pH égal à 7,4 et de tonicité équivalente à une solution de chlorure de sodium 10%. L'hémolyse est déterminée par colorimétrie photoélectrique (absorbance lue à 540 nm) ou par densitométrie photoélectrique (figure 14).

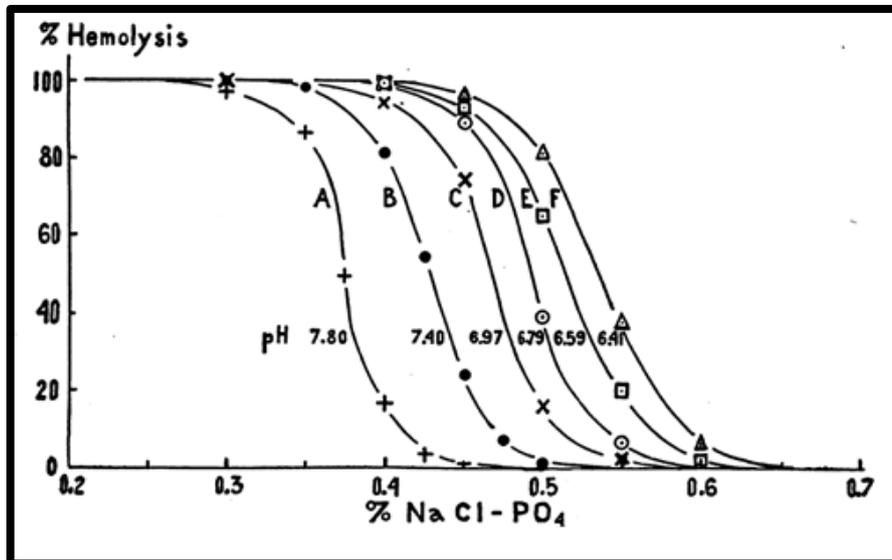


Figure 14 : Courbes d'hémolyse de Parpart [79]

Parpart met en évidence que certains facteurs influencent la résistance osmotique :

- Le pH de la solution saline : une diminution de pH de 0,1 correspond à l'apparition de l'hémolyse à une concentration saline augmentée de 0,01 % en concentration de sel. En d'autres termes, les cellules sont plus fragiles à un pH acide.
- La température : la fragilité osmotique diminue lorsque la température diminue.
- L'environnement chimique.

Ces facteurs doivent être maîtrisés et la méthode standardisée pour avoir une méthode fiable et reproductible.

La méthode de Dacie [80], méthode en point final est la première technique manuelle qui a été introduite en routine par les laboratoires comme TFO. Les érythrocytes sont placés dans une série de tubes de concentrations en chlorure de sodium allant de 0,1 à 0,9%. L'hémolyse est mesurée par spectrophotométrie, en mesurant l'hémoglobine libre dans la solution (540 nm).

Les anciennes méthodes décrites ci-dessus soumettent les globules rouges à un choc osmotique brutal, à la différence des « nouvelles » méthodes qui exposent les érythrocytes à une variation graduelle de force ionique, ce qui permet de mesurer la résistance membranaire jusqu'au point de rupture. C'est le principe de l'hémolyse douce.

### b) L'hémolyse douce

Ces méthodes ont l'avantage d'être plus précises, plus rapides, plus reproductibles (instruments automatisés) et d'utiliser de faible quantité de sang.

➤ Méthodes par diffusion

- Danon : diffusion par dialyse [81-85]

En 1967, Danon a développé un instrument électro-optique, le Fragiligraph® qui mesure en temps réel la résistance des érythrocytes face à l'hémolyse provoquée par un stress osmotique progressif. C'est une micro-méthode qui a l'avantage d'être rapide (5 minutes) et d'utiliser des quantités très faibles de sang (figure 15).

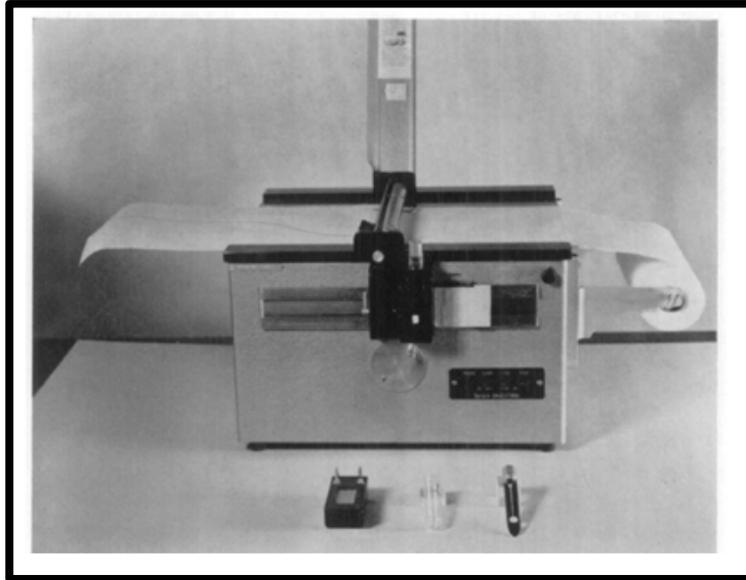


**Figure 15 : Le Fragiligraph® [82]**

Le sang est dilué dans une solution isotonique de NaCl (pH 7.3) puis est introduit dans une cuvette constituée d'un sac de dialyse. La température est contrôlée tout au long de l'analyse. Le sel va progressivement diffuser dans le bécher, à travers le sac de dialyse, ce qui va provoquer une diminution de la tonicité de la cuvette contenant les érythrocytes (la force ionique passe de 0,154 M à 0,025 M). Les globules rouges vont se gonfler d'eau jusqu'à leur rupture. La concentration en sel de la suspension est extrapolée en mesurant la conductance du bécher. L'hémolyse est déterminée par un système optique qui mesure la transmission lumineuse et se traduit par une augmentation progressive de la transmission lumineuse dans la suspension de globules rouges. L'enregistrement en continu de la transmission lumineuse et la conductance donne une courbe cumulative de fragilité osmotique.

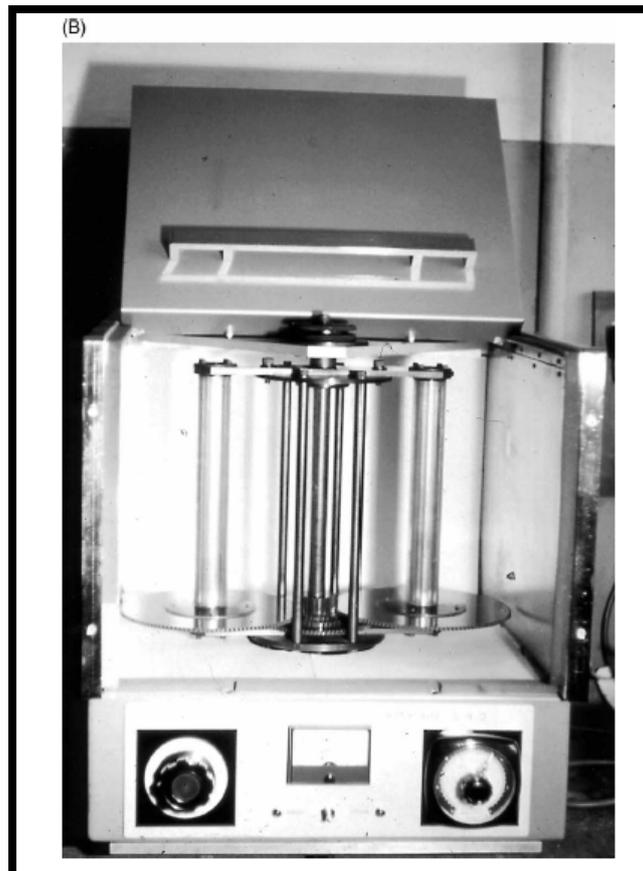
Danon souligne le fait que ce test pourrait être utilisé dans les banques de sang. Il permettrait d'identifier les CGR qui pourraient être inefficaces, c'est-à-dire ayant une courte survie *in vivo* et de reconnaître les CGR ayant un stockage stable (conservation stable), ce qui permettrait d'allonger la durée de stockage.

- Le Spinco Analytrol adapté au TFO [86] est une méthode similaire à celle de Danon, le sac de dialyse est remplacé par un tube de dialyse (figure 16).



**Figure 16 : Le Spinco-Analytrol [86]**

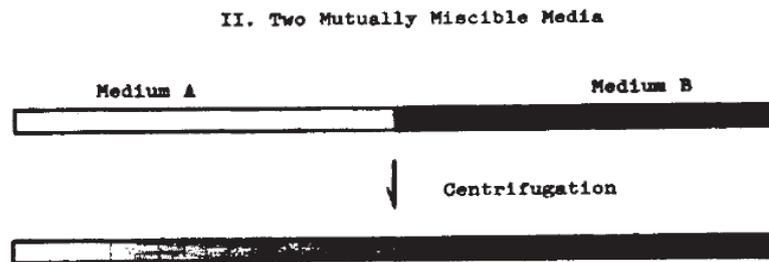
- Le Coil planet centrifuge (figure 17) [87,88]



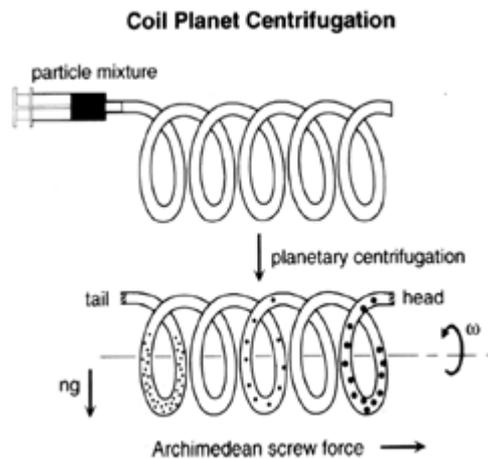
**Figure 17 : Coil planet centrifuge [88]**

Cette méthode a été développée initialement pour la séparation et la purification de particules puis a été adaptée pour les tests de fragilité osmotique des érythrocytes. Elle a notamment été utilisée dans les hôpitaux japonais.

Le Coil planet centrifuge est constitué d'une bobine contenant deux liquides miscibles, une solution saline physiologique et de l'eau distillée. La bobine a un mouvement de rotation lente similaire à celui des planètes et la centrifugation permet d'obtenir un gradient de densité linéaire entre les deux milieux (voir schéma ci-dessous, figures 18 et 19). Le sang introduit (2 à 3  $\mu\text{L}$ ) va ainsi être soumis à un environnement hypotonique croissant.

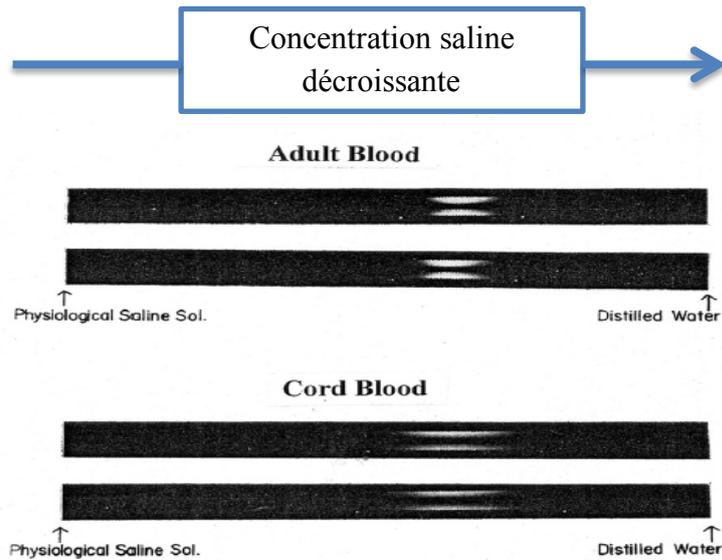


**Figure 18 : Gradient de densité linéaire [88]**



**Figure 19 : Coil planet centrifugation [88]**

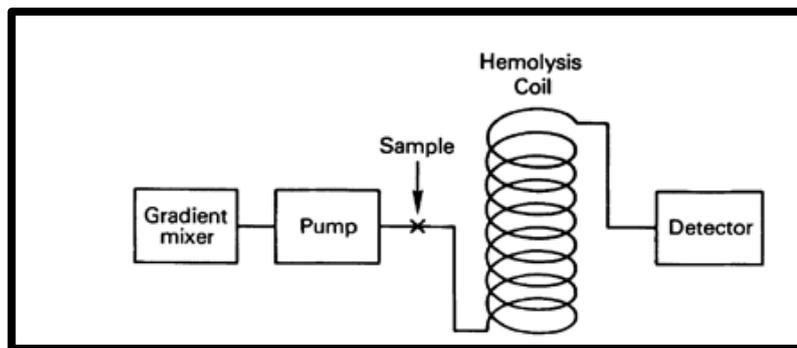
Les globules rouges migrent jusqu'au moment où ils hémolysent. L'hémolyse est déterminée par densitométrie (lecture à 547 nm). La bande blanche correspond à la distribution de l'hémoglobine et indique la fragilité osmotique de l'échantillon (figure 20). L'hémolyse minimale et l'hémolyse maximale sont facilement estimées.



**Figure 20 : Résultats obtenus : une bande élargie vers le côté gauche correspond à une plus grande fragilité osmotique [87,88]**

➤ Méthode par dilution en flux continu [89, 90]

Une pompe délivre un flux continu d'une solution de chlorure de sodium de concentration décroissante (solution de Dacie, gamme de concentration qui débute à 0,85%). L'hémoglobine éluée est détectée par méthode optique (filtre à 547 nm) en fin de colonne (figure 21). La concentration saline est mesurée par conductance.



**Figure 21 : Méthode en flux continu [90]**

**c) Cytométrie en flux [91-96]**

Développement de méthodes de cytométrie en flux pour le diagnostic de sphérocytose héréditaire. Le principe est de déterminer par cytométrie en flux les cellules résiduelles d'une solution érythrocytaire saline suite à l'exposition à une solution hypotonique.

#### d) L'Osmocells®

L'Osmocells® sera détaillé dans la partie « matériels et méthodes ».

## 2. Evolution de la fragilité osmotique des CGR au cours du stockage

Dans la littérature, plusieurs études se sont intéressées à la fragilité osmotique des concentrés érythrocytaires au cours de leur stockage.

Le principe est de mettre en suspension des CGR dans des solutions de différentes concentrations salines (gamme de chlorure de sodium allant de 0.9% à 0.1% le plus souvent). Les tests sont effectués à différents temps du stockage, par exemple à J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42. Après centrifugation, l'hémoglobine libre du surnageant est mesurée par spectrophotométrie (absorbance lue à 540 nm). Les TFO peuvent différer par les solutions salines utilisées, le type de CGR (solution de conservation, déleucocytation pas tout le temps renseignée) ou par la méthode de détection de l'hémolyse.

La fragilité osmotique peut être évaluée en déterminant la *Mean Coruscular Fragility* (MCF), index qui correspond à la concentration saline responsable de 50% d'hémolyse. Plus l'index est élevé, plus les globules rouges lysent à une concentration saline élevée. Donc plus l'index est élevé, plus les érythrocytes sont fragiles. Plusieurs études ont montré une augmentation significative de la MCF au cours du stockage, allant de 6 à 18%, par exemple : (tableau V, figure 22).

**Tableau V: Étude de la variation de la MCF au cours du stockage**

Etudes	Vassilis L. Tzounakas, <i>et al</i> [97]	Zehnder, <i>et al</i> [98]	Vassilis L. Tzounakas, <i>et al</i> [99]	Almizraq , <i>et al</i> [43]
	<b>MCF (%)</b>			
<b>Type de CGR</b>	120 CPDA non déleucocytés	10 CPD-SAG-M déleucocytés	10 CPD-SAG-M déleucocytés	30 CPD-SAG-M déleucocytés
<b>Type d'hémolyse</b>	Brutale	Brutale	Brutale	Brutale
<b>J0</b>	/	/	0,45	0,46
<b>J1</b>	/	0,47	/	/
<b>J2</b>	0,45	/	0,49	/
<b>J35</b>	0,55	/	/	/
<b>J40</b>	/	/	/	0,50
<b>J42</b>	/	0,50	0,54	/

CPDA (Citrate-Phosphate-Dextrose-Adénine)

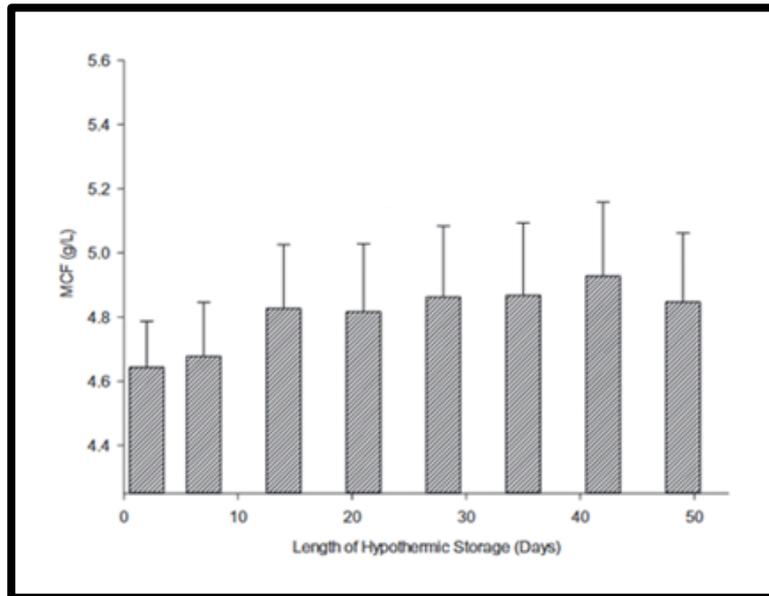


Figure 22 : MCF en fonction de la durée de stockage [43]

D'autres études ont également montré une fragilité osmotique augmentée de façon significative pendant le stockage [20, 26, 35, 43, 45, 46].

Blasi [30] a mis en évidence une relation entre la durée de stockage, l'altération morphologique des érythrocytes et la fragilité osmotique. Comme décrit précédemment, la morphologie discoïde des globules rouges est altérée au cours du stockage. Les érythrocytes biconcaves laissent progressivement place à une deuxième population, composée notamment de sphérocytes et d'échinocytes qui conduiront à la libération de microvésicules. Or, il est maintenant bien connu que les sphérocytes ont une plus grande fragilité osmotique par rapport aux globules rouges biconcaves du fait d'un ratio surface/volume diminué [26, 41, 100]. Dans cette étude, le stockage induit une augmentation linéaire de l'hémolyse, qui est elle-même proportionnelle au stress osmotique (figure 23).

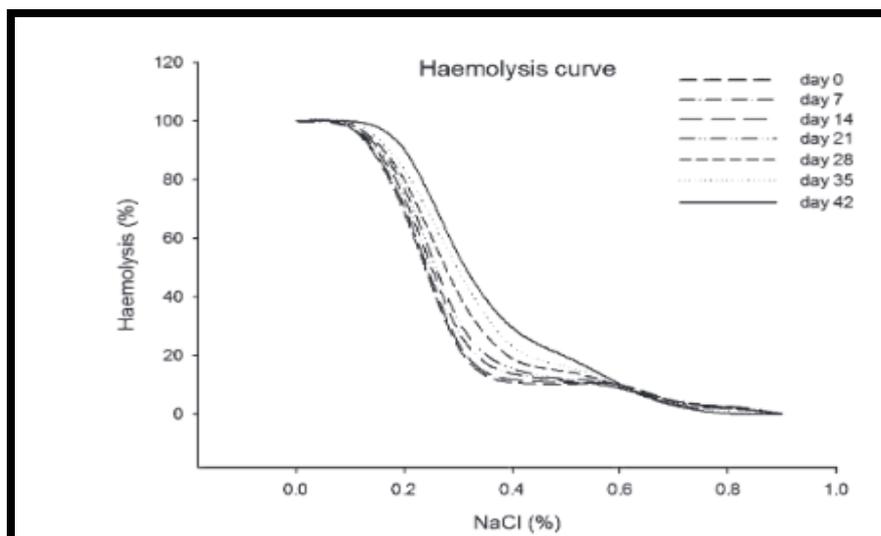


Figure 23 : Courbes d'hémolyse à différents temps du stockage [30]

Les courbes de fragilité osmotique montrent un décalage vers la droite, signe d'une plus grande fragilité. Les globules rouges hémolysent plus rapidement à des concentrations salines plus élevées.

De plus, l'auteur remarque que la fragilité augmente au fur et à mesure du stockage et plus particulièrement à partir de J21, période où les modifications morphologiques des érythrocytes sont significatives (seulement 50% environ des hématies ont une morphologie normale) [20, 46, 99]. La majorité des globules rouges du CGR a une fragilité osmotique normale mais une petite population présente une susceptibilité plus importante à la lyse osmotique [35, 44, 41]

La fragilité osmotique des CGR au cours du stockage serait donc associée aux modifications morphologiques des globules rouges (sphérocytose, formation et libération de microvésicules), induisant la diminution du ratio surface/volume (perte de membrane/ gain de volume) [58].

#### **IV. Variabilité inter et intra donneur de la qualité des CGR**

La qualité d'un CGR dépend à la fois du processus de préparation, du stockage mais aussi des caractéristiques du donneur. En effet, les donneurs sont hétérogènes, ils présentent tous des différences intrinsèques qui pourraient avoir un impact sur les lésions stockage des CGR mais aussi sur le « *recovery* » post-transfusionnel, c'est-à-dire sur la recirculation des globules rouges. On parle de variabilité donneur spécifique ou variabilité inter individuelle [101-105].

Dans la littérature, de nombreux auteurs ont mis en évidence une variabilité inter individuelle des lésions de stockage. Nous pouvons notamment citer comme paramètres fortement donneurs dépendants : l'hémolyse, le *recovery in vivo*, la fragilité osmotique, l'accumulation de métabolites et de microparticules ainsi que la sensibilité au stress oxydant.

Cette variabilité est le fait de facteurs génétiques (le *background* du donneur) mais aussi de facteurs non génétiques. Ces facteurs, propres à chaque donneur, pourraient avoir un impact sur les propriétés physico-biochimiques des globules rouges, se traduisant par des performances de stockage différentes [97, 99, 103-105]. En effet, le profil de chaque donneur modulerait la réponse des érythrocytes au stress, favorisant plus ou moins l'hémolyse, ce qui pourrait impacter l'efficacité de la transfusion et le risque de complications post-transfusionnelles.

##### **1. Facteurs non génétiques**

###### **a) Le style de vie**

Le style de vie des donneurs peut être déterminant pour la résistance à l'hémolyse des globules rouges. Certaines situations provoquent une exposition continue au stress oxydant, une diminution des capacités anti-oxydantes ou encore une modification rhéologique des érythrocytes.

➤ La diète

Le contenu lipidique de la membrane du globule rouge dépend de la concentration lipidique extracellulaire, une alimentation trop riche en lipide pourrait ainsi altérer la fluidité membranaire. L'hypercholestérolémie serait associée à un stress oxydant exacerbé et à un environnement pro-inflammatoire, conduisant à des dommages membranaires et à une rigidité érythrocytaire.

➤ L'hygiène de vie

Une consommation excessive d'alcool affecterait négativement les propriétés rhéologiques des érythrocytes. Chez les patients alcooliques, on observe une déformabilité des globules rouges diminuée, des capacités anti-oxydantes réduites ainsi qu'un stress oxydant augmenté.

Le tabac expose les érythrocytes aux oxydants et aux toxiques. Les globules rouges des fumeurs sont caractérisés par une déformabilité diminuée, une fragilité osmotique augmentée ainsi que l'accumulation de ROS [106, 107].

L'activité physique insuffisante ou à l'inverse extrême augmenterait le stress oxydant, alors qu'une activité régulière serait bénéfique sur l'homéostasie redox du globule rouge.

**b) Conditions médicales du donneur**

Des maladies telles que l'hypertension artérielle ou encore le diabète pourraient affecter les propriétés des globules rouges. Le diabète de type deux serait responsable d'une fragilité osmotique augmentée des érythrocytes, fragilité corrélée au taux d'hémoglobine glyquée. L'hémoglobine glyquée élevée s'accompagne de l'altération des propriétés structurelles et des propriétés membranaires [108-110].

**c) Autres facteurs [111, 112]**

La fréquence des dons influencerait la résistance des globules rouges à l'hémolyse. En effet, les sujets avec un taux de ferritine bas auraient une plus grande susceptibilité à l'hémolyse.

## 2. Facteurs génétiques [111]

Des facteurs génétiques intervenant dans la survie, la stabilité structurelle, le métabolisme et l'équilibre oxydant/antioxydant affecteraient la survie des globules rouges *in vitro*. Nous pouvons citer comme exemples :

-Certaines pathologies héréditaires érythrocytaires peuvent induire une prédisposition à l'hémolyse. Elles pourraient ainsi impacter la survie des globules rouges stockés et la survie des globules rouges après transfusion. Nous pouvons prendre comme exemple la sphérocytose héréditaire, les thalassémies, le déficit enzymatique en G6PD.

-Le sexe : les données de la littérature restent controversées. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence que les femmes sont plus résistantes au choc osmotique et au stress mécanique. L'hémolyse *in vitro* est plus basse chez les femmes par rapport aux hommes. Les hormones influenceraient l'intégrité membranaire des érythrocytes notamment la testostérone [102].

-L'ethnicité : les Africains Américains auraient une plus fragilité osmotique

-Les formes familiales de pseudo-hyperkaliémie : le potassium extracellulaire augmente de façon significative au cours de la première période de stockage

- Le niveau en glutathion (GSH, antioxydant)

Il serait donc intéressant de détecter au plus tôt les donneurs aux capacités de stockage « moins performantes », conduisant à des CGR de « moins bonne qualité » et qui pourraient être moins efficaces (survie *in vitro* et post-transfusionnelle plus faibles) et à risque plus élevé de réactions post-transfusionnelles. Pour cela, des bio-marqueurs donneurs dépendants au moment du don pourraient être utilisés. Nous pouvons citer comme exemple le test de fragilité osmotique.

C'est un test facilement réalisable en routine au laboratoire. La fragilité osmotique fait partie des lésions de stockage et est donneur dépendante. Comme l'a souligné Tzounakas *et al*, la fragilité osmotique à J0 serait corrélée à la fragilité osmotique à la fin du stockage (figure 24) [99].

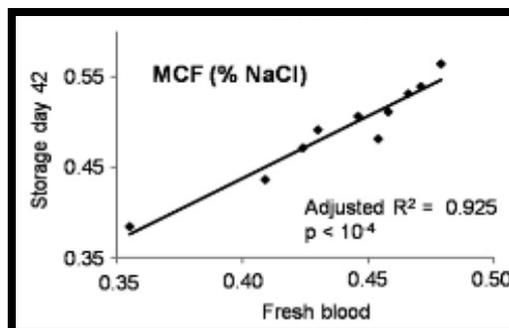


Figure 24 : Corrélation de la fragilité osmotique J0 versus J42 [99]

Une fragilité osmotique augmentée à J0 du don pourrait signifier une plus grande fragilité des érythrocytes au cours du stockage et donc des CGR moins efficaces.

Pour être considéré conforme à la délivrance, l'hémolyse du CGR doit être inférieure à 0,8% à la fin du stockage [4]. C'est le seul critère qualité représentatif des lésions de stockage en France. Aux Etats-Unis, la *Food Drug Administration* (FDA) requiert un critère supplémentaire : un CGR est considéré conforme si son *recovery in vivo* est supérieur à 75% dans les 24 heures suivant la transfusion [113], c'est-à-dire si moins de 25% des globules rouges sont éliminés de la circulation 24 heures après la transfusion.

En plus des gold-standards utilisés actuellement, l'étude de paramètres donneurs-dépendants sur le sang frais, comme la fragilité osmotique, permettrait d'adapter la stratégie transfusionnelle. Si l'on dépiste une fragilité osmotique augmentée chez un donneur, le CGR correspondant pourrait être stocké pour une durée plus réduite ou serait à éviter chez des populations à risques (nouveau-nés par exemple). Il serait intéressant de trouver un marqueur pertinent, représentatif des lésions de stockage et facilement réalisable en routine au laboratoire afin d'optimiser le stockage et la prise en charge du patient. Le test de fragilité osmotique semble remplir ces différents critères.

Cette idée d'introduire le test de fragilité osmotique comme test de routine dans les banques de sang, a déjà été proposée par Danon en 1964 [81].

Avant de présenter nos manipulations, nous allons décrire l'impact potentiel des lésions de stockage sur la qualité des CGR ainsi que sur l'efficacité transfusionnelle.

## V. Impact des lésions de stockage [21, 33, 114]

Nous avons décrit les principales lésions touchant les érythrocytes au cours de la conservation des CGR. Il est légitime de se poser la question de l'impact de ces lésions sur la qualité des CGR et sur l'efficacité transfusionnelle ainsi que sur l'apparition d'évènements indésirables transfusionnels. La plupart des données de la littérature exposent l'hypothèse suivante : les lésions de stockage pourraient être impliquées dans une baisse d'efficacité transfusionnelle (viabilité pré et post-transfusionnelle) ainsi que dans des évènements indésirables post-transfusionnels.

### 1. Efficacité de la transfusion

#### a) Viabilité des globules rouges : hémolyse pré-transfusionnelle et post-transfusionnelle [21]

On considère que les lésions de stockage seraient responsables d'environ 20 à 30 % de l'élimination des globules rouges de la circulation 24 heures après la transfusion. En effet, des hématies sénescents s'accumulent progressivement au cours du stockage et toutes ne seront pas hémolysées avant la fin du stockage. Les hématies concernées seraient hémolysées puis éliminées de la circulation dans l'heure suivant la transfusion. Nous pouvons de ce fait supposer que cette élimination rapide des globules rouges peut jouer sur l'efficacité de la transfusion.

De plus, un homme sain élimine environ  $1 \times 10^{10}$  érythrocytes par heure, ce qui correspond environ à 1 mg de fer destiné à la phagocytose. Si 25% des globules rouges d'une unité de CGR sont éliminés en une heure, cela correspondrait environ à 60 mg de fer destiné à la phagocytose. La quantité de fer devant être prise en charge augmente ainsi de 60 fois. Nous pouvons aisément comprendre que cela submergerait les systèmes de clairance du fer, ce qui conduirait à une surcharge en fer (fer intracellulaire, fer non lié à la transferrine en circulation) [115].

Les conséquences potentielles de l'hémolyse pré et post-transfusionnelle pourraient être en lien avec la surcharge en fer et l'accumulation de potassium dans le surnageant (état pro-inflammatoire, défaillance d'organes...) notamment dans certaines situations comme chez les insuffisants rénaux, les nouveau-nés, lors de transfusions massives [115].

#### b) Impact des microvésicules [116, 117]

Physiologiquement, plus de  $10^9$  microvésicules/mL sont en circulation chez un homme sain. Un CGR stocké peut contenir une quantité significative de microvésicules étant donné que leur concentration dans le surnageant peut augmenter jusqu'à vingt fois à la fin du stockage. Nous pouvons donc supposer qu'une partie de ces microvésicules sont présentes dans la circulation chez le receveur, se traduisant par des perturbations post-transfusionnelles.

➤ Thrombogénicité

Les microvésicules expriment la phosphatidylsérine (PS) à leur surface, or il est maintenant bien établi que la PS a un rôle thrombogénique.

L'expression de la PS modifie la charge membranaire. Normalement neutre, elle devient négative, offrant ainsi un site d'ancrage pour les complexes enzymatiques de la coagulation. La PS favorise l'activation de la tenase et de la prothrombinase, activant de ce fait la cascade de la coagulation et se traduisant par la génération de thrombine. De plus, la PS favorise l'activité du facteur tissulaire, le principal initiateur de la voie extrinsèque de la cascade de coagulation. Ainsi, l'expression de la PS pourrait favoriser des états thromboemboliques.

Le stockage des CGR étant associée à une augmentation significative du nombre de microvésicules, cela pourrait favoriser un état pro coagulant avec des manifestations thromboemboliques.

➤ NO : agrégation plaquettaire, dommages oxydatifs

En conditions normales, le NO ne peut pas réagir avec l'hémoglobine contenue dans les érythrocytes car il n'arrive pas à diffuser à travers la membrane érythrocytaire. A l'inverse, le NO diffuse facilement à travers la membrane des microvésicules.

L'hémoglobine libre provenant de l'hémolyse ainsi que l'hémoglobine provenant des microvésicules vont réagir avec le NO et diminuer sa biodisponibilité. Or le NO est un puissant vasodilatateur, a un pouvoir antioxydant et inhibe l'agrégation plaquettaire.

En transfusant un CGR contenant une quantité significative de microvésicules, la conséquence post-transfusionnelle pourrait être une dérégulation des fonctions endothéliales ainsi que des défaillances d'organes (ischémie) [56].

➤ Inflammation : [55, 117-123]

Les microvésicules ont une activité pro-inflammatoire. En effet, elles stimulent les polynucléaires neutrophiles et les activent. De plus, elles induisent la stimulation de cytokines par les monocytes et les macrophages (interleukine 2, 6,7 et TNF- $\alpha$ ) ainsi que les lymphocytes T CD4-CD8. Enfin, les MV interviennent aussi dans la médiation du complément et joueraient un rôle dans le TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury).

**c) Morphologie et rhéologie des globules rouges [56, 124, 125]**

Au cours du stockage, la morphologie et la rhéologie des globules rouges sont modifiées, ils sont moins déformables, leur viscosité est augmentée. Suite à ces altérations, nous pouvons supposer que les globules rouges deviennent moins efficaces même si la littérature considère que leur capacité à délivrer l'oxygène aux tissus est conservée.

Une autre conséquence de l'altération morphologique (ratio surface/volume diminué) serait la rétention splénique. En effet, la morphologie et le ratio S/V sont des critères importants dans la rétention splénique et donc dans la capacité de recirculation des érythrocytes. La capacité des

globules rouges à se déformer dépend de trois paramètres : le ratio S/V, la viscosité cytoplasmique et la déformabilité membranaire.

Dans une étude de Safeukui [124], la perte de 18% de la surface érythrocytaire, correspondant à un ratio S/V diminué de 27%, conduit à une plus grande séquestration splénique (figure 25).

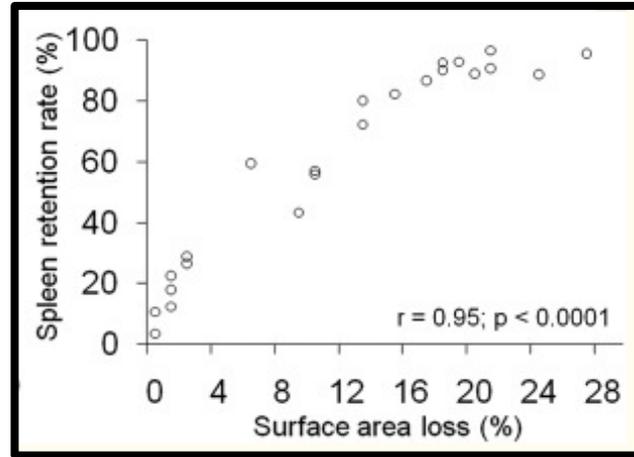


Figure 25 : Perte de surface et rétention splénique [124]

De plus, la fragilité osmotique est augmentée à la fin du stockage des CGR. Les érythrocytes sont de ce fait moins résistants face à un stress osmotique et plus enclin à l'hémolyse (figure 26).

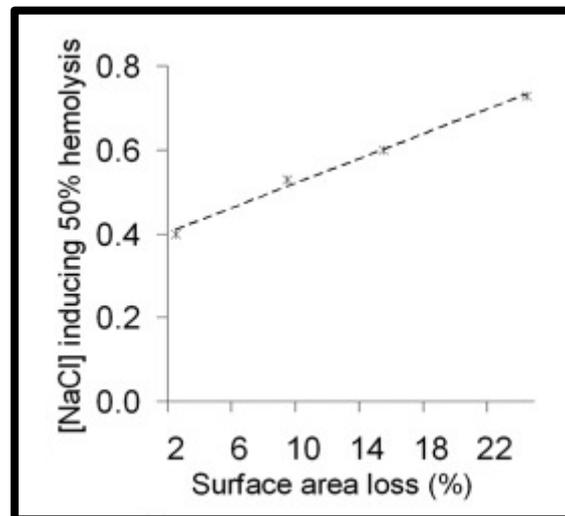


Figure 26 : Perte de surface et MCF [124]

## 2. Impact clinique des lésions de stockage des CGR

### a) Effets indésirables receveur (EIR) liés aux lésions de stockage [2, 126, 127, 128]

#### ➤ Définition et épidémiologie de l'EIR

Un EIR correspond à l'apparition au cours ou au décours d'une transfusion, de manifestations cliniques ou d'évènements inattendus, inexpliqués par la pathologie du patient. Les EIR impliquent tous les types de PSL et doivent être déclarés à l'hémovigilance.

Les EIR peuvent être immédiats, avec la plupart du temps des manifestations cliniques dans les 8 jours suivant la transfusion (le plus souvent dans les 24 heures), ou retardés (apparition au-delà de 8 jours) avec un diagnostic essentiellement biologique.

Une fois l'enquête d'hémovigilance terminée, les EIR sont classés selon leur grade de sévérité et leur niveau d'imputabilité :

- Grades de sévérité : 1 (non sévère), 2 (sévère), 3 (menace vitale immédiate), 4 (décès)

-Niveaux d'imputabilité : NE (non-évaluable, données insuffisantes), 0 (imputabilité improbable), 1 (imputabilité possible), 2 (imputabilité probable), 3 (imputabilité certaine).

Les EIR peuvent être classés selon le mécanisme physiopathologique :

- Immunologique : allo-immunisation, incompatibilité immunologique, allergie, Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI), purpura post-transfusionnel (PPT)

- Surcharge vasculaire : œdèmes pulmonaires de surcharge, TACO (Transfusion Associated Circulating Overload) également appelé œdème pulmonaire de surcharge

- Etiologie infectieuse : contamination du PSL par un micro-organisme (bactérie, virus)

-Autres causes : réaction fébrile non hémolytique, hémossidérose post-transfusionnelle, surcharges citratée et potassique en cas de transfusion massive

D'après les données 2018 de l'ANSM [2], les EIR d'imputabilités probables ou certaines sont par ordre de fréquence : les allo immunisations (62%), les allergies (13%), les réactions fébriles non hémolytiques (RFNH 10%), les œdèmes pulmonaires de surcharge (TACO 5%), les incompatibilités immunologiques (4%), les œdèmes pulmonaires lésionnels (TRALI 0,2%). Les infections bactériennes transmises par transfusion ainsi que les séroconversions virales sont très rares.

L'incidence des EIR est de 293 pour 100 000 PSL cédés et de 169 EIR pour 10 000 receveurs. La majorité des EIR (95%) est de grade 1. Dans le Nord Est, l'incidence des EIR est de 338 pour 100 000 PSL cédés.

L'EIR le plus fréquent à la suite d'une transfusion de CGR est l'allo-immunisation isolée, suivie de la RFNH, du TACO, de l'allergie, de l'incompatibilité immunologique et du TRALI (figure 27).

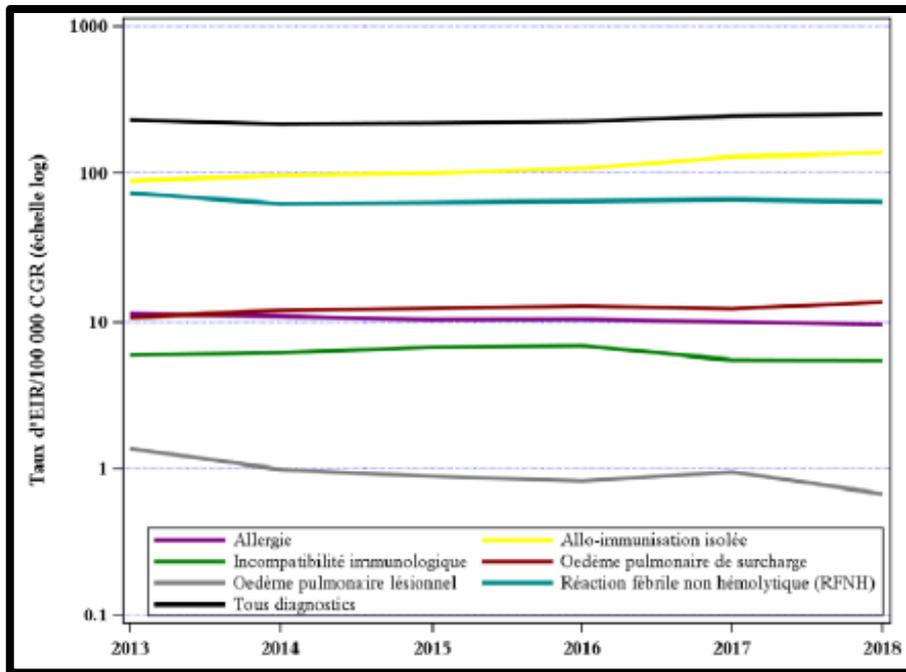


Figure 27 : EIR et CGR de 2013 à 2018 [2]

Concernant les décès imputables à la transfusion, leur incidence est de 0,23 décès pour 100 000 PSL cédés et de 0,13 décès pour 10 000 patients transfusés. Sur la période de 2013 à 2018, le TACO représente la principale cause de décès, de l'ordre de 63% (figure 28).

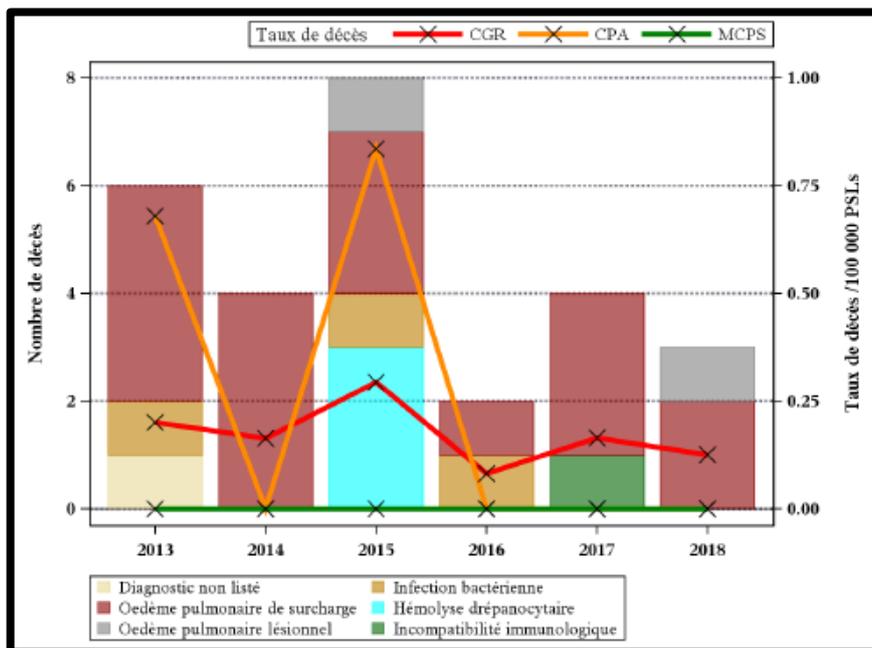


Figure 28 : Décès de 2013 à 2018 [2]

Nous ne détaillerons que les EIR en lien avec les lésions de stockage, à savoir les réactions d'hypersensibilité immédiate, la réaction fébrile non hémolytique, le TRALI, les surcharges potassiques ainsi que les surcharges en fer.

➤ **EIR d'origine immunologique**

- ✓ Allergie : réactions d'hypersensibilité immédiate [2, 128]

Les allergies sont pour la majorité de grade 1, avec une incidence de 4,6 pour 100 000 CGR. Les manifestations allergiques surviennent pendant ou dans les 4 heures suivant la transfusion.

La physiopathologie reste mal connue, elle résulte de facteurs propres au donneur, au PSL et au receveur. Elle peut être liée à 3 mécanismes :

- Dépendant du receveur : des anticorps présents chez le receveur vont réagir avec un allergène contenu dans le PSL, pouvant provenir soit de la poche, soit du processus de prélèvement ou encore d'un médicament (anticorps anti-pénicilline).
- Dépendant du donneur : présence dans le PSL d'anticorps ou de lymphocytes provenant d'un donneur sensibilisé.
- Dépendant du PSL : présence de médiateurs accumulés au cours de la conservation du PSL, comme l'histamine, la bradykinine, des cytokines, susceptibles de déclencher une réaction chez le receveur.

- ✓ Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI) : l'œdème lésionnel post-transfusionnel [2, 5, 6, 129, 130]

L'incidence du TRALI est de 0,66 pour 100 000 PSL et 0,39 pour 10 000 patients transfusés. Le TRALI concerne la transfusion de CGR le plus souvent (figure 27).

L'œdème lésionnel post-transfusionnel est un œdème pulmonaire lésionnel et inflammatoire, qui provoque des lésions au niveau des capillaires pulmonaires suite à l'activation de leucocytes.

- Mécanisme physiopathologique : un mécanisme receveur dépendant associé à un mécanisme donneur dépendant.

- Mécanisme receveur-dépendant : le receveur est soumis à des conditions pro-inflammatoires ou agressives (hémopathies sous chimiothérapie, transfusion massive, circulation extracorporelle, chirurgie cardiaque, sepsis, polytraumatisme), provoquant une réponse inflammatoire systémique. Cette réponse inflammatoire se traduit par une libération accrue de cytokines ainsi qu'une activation de l'endothélium pulmonaire. Les polynucléaires neutrophiles vont alors adhérer aux capillaires pulmonaires et vont être "séquestrés", on parle de leucostase.

-Mécanisme donneur-dépendant : il est dû à la présence dans le PSL de composants qui vont réagir avec les antigènes du receveur. Il peut s'agir soit d'un conflit immunologique entre des anticorps du donneur (anti-neutrophiles, anti-HLA de classe I ou II) et les antigènes correspondants du receveur, soit de la présence de lipides bioactifs (lysophosphatidylcholines) ou de cytokines pro inflammatoires accumulés dans le PSL au cours du stockage.

Ces composants amenés par la transfusion vont activer les polynucléaires qui vont se dégranuler et ainsi libérer leur contenu granulaire, à savoir des radicaux oxydants et des enzymes. Ceci va aboutir à des lésions endothéliales des capillaires et de la membrane alvéolaire, ainsi qu'un exsudat alvéolaire, se traduisant par l'apparition d'un œdème.

Les manifestations cliniques surviennent moins de 6 heures après la fin de la transfusion, le plus souvent dans les deux heures, avec la survenue brutale d'un syndrome de détresse respiratoire aigu (*Acute Lung Injury*).

✓ Réaction fébrile non hémolytique (RFNH) [2, 126, 127]

Le plus souvent de grade 1 (97,6% des cas), l'incidence est de 18,2 pour 100 000 CGR cédés. Elle est provoquée par la présence de cytokines dans les PSL, secondairement à l'accumulation de leucocytes au cours de leur conservation.

Les manifestations cliniques sont mineures, avec l'apparition de fièvre (supérieure à 38°C et augmentation d'au moins 1°C de la température pré-transfusionnelle) et/ou frissons au cours ou dans les heures suivant la transfusion.

✓ Réaction transfusionnelle hypotensive [2, 132]

➤ Mécanismes physiopathologiques :

- Accumulation de bradykinine résultant du filtre utilisé lors de la transfusion, chez les patients traités par inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou présentant des anomalies du métabolisme de la bradykinine

- Présence de cytokines contenues dans un PSL

- Vasodilatation réflexe lors de l'administration du PSL, notamment chez les patients en état d'hypovolémie ou de vasoconstriction

➤ Clinique : le plus souvent au cours des 30 premières minutes au décours de la transfusion

- Chute d'au moins 30mm Hg de la pression artérielle systolique et/ou diastolique ou baisse de 20%

- ± des signes liés à l'hypotension : dyspnée, angoisse, hypothermie, sueurs, tachycardie, marbrures, perte de connaissance, nausée et vomissements. Peut aller jusqu'à l'état de choc

- Surcharge en fer [2, 126, 127] : hémochromatose post-transfusionnelle (hémosidérose post-transfusionnelle)

Concerne en grande majorité les sujets polytransfusés et les transfusions au long cours (anémie chronique par exemple). Les organes cibles de la surcharge en fer sont le cœur, le foie, les glandes endocrines et provoque des atteintes cardiaques, hépatiques et endocriniennes. Le diagnostic se base sur deux ferritinémies supérieures à 1000 ng/mL, à trois mois d'intervalle, après la transfusion d'au moins vingt CGR (hors contexte inflammatoire, infectieux ou métabolique aigu ou chronique).

- Surcharge potassique [2]

La surcharge est un incident peu fréquent, pouvant induire une hyperkaliémie notamment lors de transfusions massives, en présence de facteurs favorisants (insuffisance rénale sévère) et pouvant se traduire par des troubles cardiaques (onde T pointue à l'électrocardiogramme)

#### **b) Lien entre la durée de stockage des CGR et l'impact clinique des lésions de stockage**

L'impact clinique des lésions de stockage reste actuellement très controversé. De nombreuses études se sont intéressées au potentiel effet délétère de la transfusion de CGR âgés par rapport à des CGR plus frais. Généralement, les CGR sont considérés « jeunes » s'ils sont stockés depuis moins d'une semaine et les CGR sont considérés « âgés » s'ils sont stockés depuis plus de trois semaines.

Dans la littérature, plusieurs populations sont étudiées : les patients en réanimation, en soins intensifs ou encore en chirurgie cardiaque. Les paramètres pris en compte sont la mortalité et la morbidité (défaillance d'organes, durée de séjour, complications infectieuses).

Certaines études montrent un lien significatif entre la durée de stockage des CGR et la survenue de complications (morbidité, mortalité). Autrement dit, les CGR conservés plus longtemps seraient moins sécuritaires pour les patients. C'est la conclusion des études suivantes :

- Lien entre la durée de conservation et la morbidité [133]
- Lien entre la durée de conservation et les infections chez les traumatismes sévères [134]
- Lien entre la durée de conservation et les complications post-opératoires, la mortalité et la durée d'hospitalisation en chirurgie cardiaque [135, 136]
- Lien entre la durée de conservation et la mortalité : plus les CGR sont âgés, plus il y a un risque de mortalité [137, 138]

D'un autre côté, plusieurs études randomisées récentes ne montrent aucun avantage à utiliser des CGR jeunes par rapport à des CGR âgés [139, 140, 141], tant au niveau de la morbidité que de la mortalité. Plusieurs méta-analyses vont dans le même sens [142, 143, 144].

Les données de la littérature sont donc controversées, même si de nombreuses études cliniques se veulent rassurantes. Il n'existe aucun consensus à l'heure actuelle sur l'avantage ou l'inconvénient de transfuser du sang âgé par rapport à du sang conservé moins longtemps.

Une question se pose encore : est-il plus sécuritaire d'utiliser des CGR frais plutôt que des CGR âgés ?

# **PARTIE III : ETUDE DE LA FRAGILITE OSMOTIQUE DES CGR AU COURS DU STOCKAGE**

## **Objectifs**

Les lésions de stockage et leur appréciation restent une véritable problématique dans la gestion des CGR ; leur évaluation ne repose que sur le taux d'hémolyse actuellement, or, comme nous venons de le discuter, l'évaluation de la fragilité osmotique des globules rouges dans la poche peut avoir un intérêt, d'autant qu'un certain nombre de mécanismes impliqués dans la survenue de ces lésions impactent cette même fragilité osmotique.

Le CHRU dispose, par un partenariat avec SD Innovation, d'un appareil de nouvelle génération d'étude de la fragilité osmotique, Osmocells®.

Ainsi, ce travail vise à évaluer l'impact de la production de CGR ainsi que de la conservation sur la fragilité osmotique afin de discuter sa place éventuelle dans l'évaluation de la qualité des CGR.

Ce travail a été réalisé en partenariat étroit avec l'EFS-LC, SD Innovation et le CHRU de Nancy.

## I. Matériels et méthodes

### 1. Population étudiée

L'étude complète a été réalisée sur 9 CGR et 9 tubes EDTA provenant de 9 donneurs sains de l'EFS de Nancy. Il s'agit de dons non-thérapeutiques réalisés avec l'accord écrit du donneur. SD-Innovation a assumé la prise en charge financière de toutes nos commandes à l'EFS.

Les dons de sang sont anonymes et l'anonymat est respecté dans le cadre de cette étude. Seuls l'âge, le sexe et le groupe sanguin nous ont été communiqués. Les tubes et les CGR sont étiquetés avec un numéro d'anonymat.

L'étude a initialement commencé en février (deux séries de 5 CGR) puis a été interrompue en mars en raison de l'épidémie COVID-19 (arrêt de toutes les analyses non urgentes dont la recherche réalisée par l'EFS). Nous avons pu reprendre les expérimentations en août (2 séries, 9 CGR) mais avons tout de même intégré au manuscrit les résultats partiels des deux premières séries réalisées en mars 2020, à savoir les résultats à J0 et J1 du stockage.

### 2. Production de CGR par l'EFS

En raison du faible volume de sang nécessaire à l'analyse, trois poches stériles de 20 mL ont été produites par l'EFS à partir de la poche initiale (CGR) prélevée chez le donneur (figure 29). Pour chaque donneur, un tube EDTA a été prélevé en parallèle le jour du don (figure 30). Les CGR ont ensuite été stockés à l'EFS dans les conditions réglementaires, à savoir entre +2° et +6°. A noter que la qualification biologique n'a pas été réalisée sur les tubes EDTA compte-tenu du délai de réalisation trop court entre le prélèvement et nos manipulations.

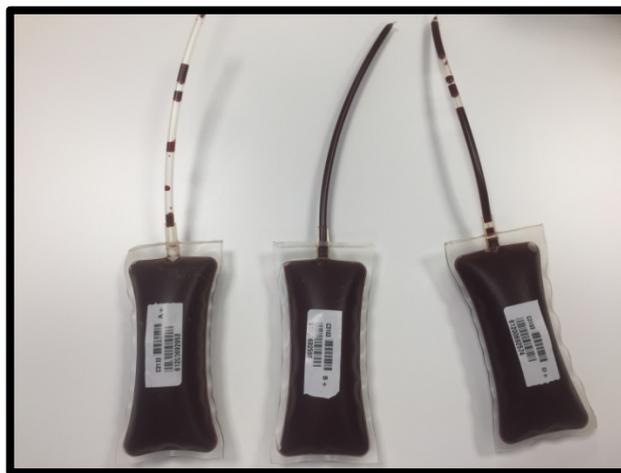


Figure 29: Poches de 20 mL



**Figure 30 : Tube EDTA avec numéro d'anonymat**

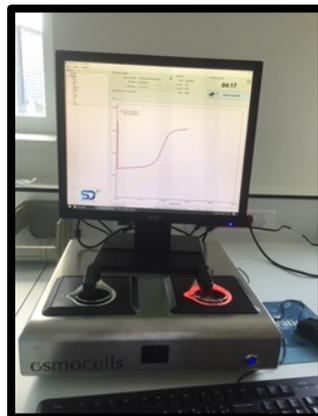
### **3. Protocole et présentation de l'Osmocells®.**

#### **a) Protocole**

La fragilité osmotique est étudiée avec l'Osmocells® au laboratoire d'hématologie du CHRU de Nancy, à J0 sur le tube EDTA, J+1, J+20 et J+40 sur le CGR correspondant.

➤ Matériel nécessaire :

- Osmocells® (figure 31)



**Figure 31 : Osmocells®**

- Membrane semi-perméable (référence OS-ELEC-20, SD Medical, figure 32)



**Figure 32 : Membrane semi-perméable**

- Electrode (référence OS-ELEC-20, SD Medical, figure 33)



**Figure 33 : Electrode**

- Bêcher, éprouvette graduée, barreau aimanté
- Eau stérile
- NaCl 0,9%
- Echantillon patient : tube EDTA ou CGR à J0/J20/J40 de stockage

La calibration de l'automate est nécessaire avant chaque série mais également après tout changement d'électrode et de membrane. Pour cela, il faut remplir 90 mL d'eau stérile dans un bêcher, y placer l'électrode puis ajouter 160 $\mu$ L de NaCl 0,9% et lancer l'acquisition de la mesure. Le matériel doit être nettoyé entre chaque analyse avec de l'eau distillée.

L'échantillon du donneur (tube EDTA ou poche de 20 mL) est dilué au 1/40<sup>ème</sup> de la façon suivante : 10 $\mu$ L de sang du patient introduit dans 390  $\mu$ L de NaCl 0,9%.

Pour lancer l'analyse, il faut remplir un bêcher de 90 mL d'eau stérile, 160 $\mu$ L de l'échantillon dilué du patient est introduit dans la membrane puis l'acquisition de la mesure est lancée.

#### **b) L'Osmocells®**

L'Osmocells® (figure 34) est un automate semi-automatique développé et commercialisé par SD Innovation, qui permet d'évaluer la résistance membranaire des globules rouges à l'hémolyse face à un stress osmotique.

Le principe de l'Osmocells® est de mesurer la résistance/fragilité osmotique des hématies lors de la diminution progressive de la concentration saline de l'échantillon contenant les globules rouges (concentration isotonique au début de l'analyse).

La membrane semi-perméable permet la diffusion des ions dans l'eau stérile, ce qui provoque une diminution de l'équilibre isotonique avec modification de la pression osmotique. Les pores des érythrocytes vont alors s'ouvrir, les globules rouges vont gonfler puis hémolyser, en libérant de l'hémoglobine dans le milieu extracellulaire.

La concentration saline de l'eau stérile est déterminée grâce à l'électrode qui mesure en continu la variation de conductance ; la concentration saline de la membrane est ainsi extrapolée. La transmission optique (laser à 700-850 nm) permet de mesurer la transmission lumineuse et de

déterminer l'indice de réfraction des globules rouges, indice qui diminue lors de l'augmentation de la transmission lumineuse (hémolyse des érythrocytes). L'analyse dure environ dix minutes. Trois paramètres sont calculés : l'hémolyse initiale, l'hémolyse maximale et l'hémolyse finale. L'hémolyse maximale correspond à la MCF, la concentration en chlorure de sodium responsable de 50% d'hémolyse.

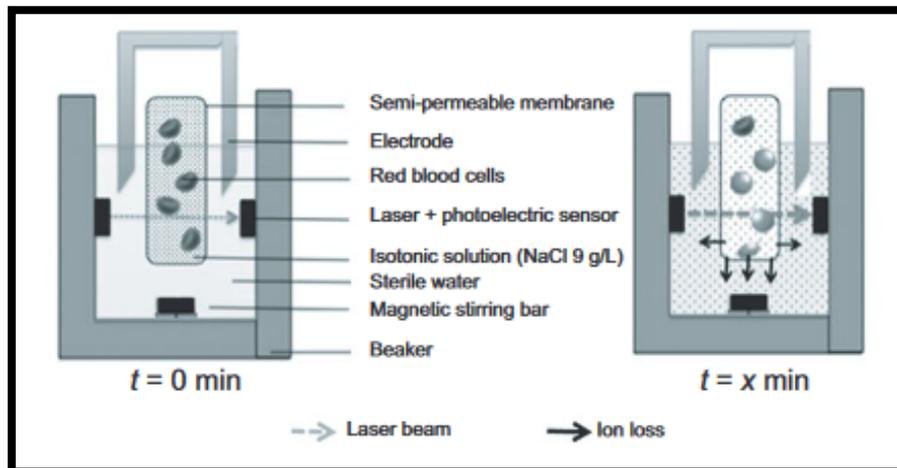
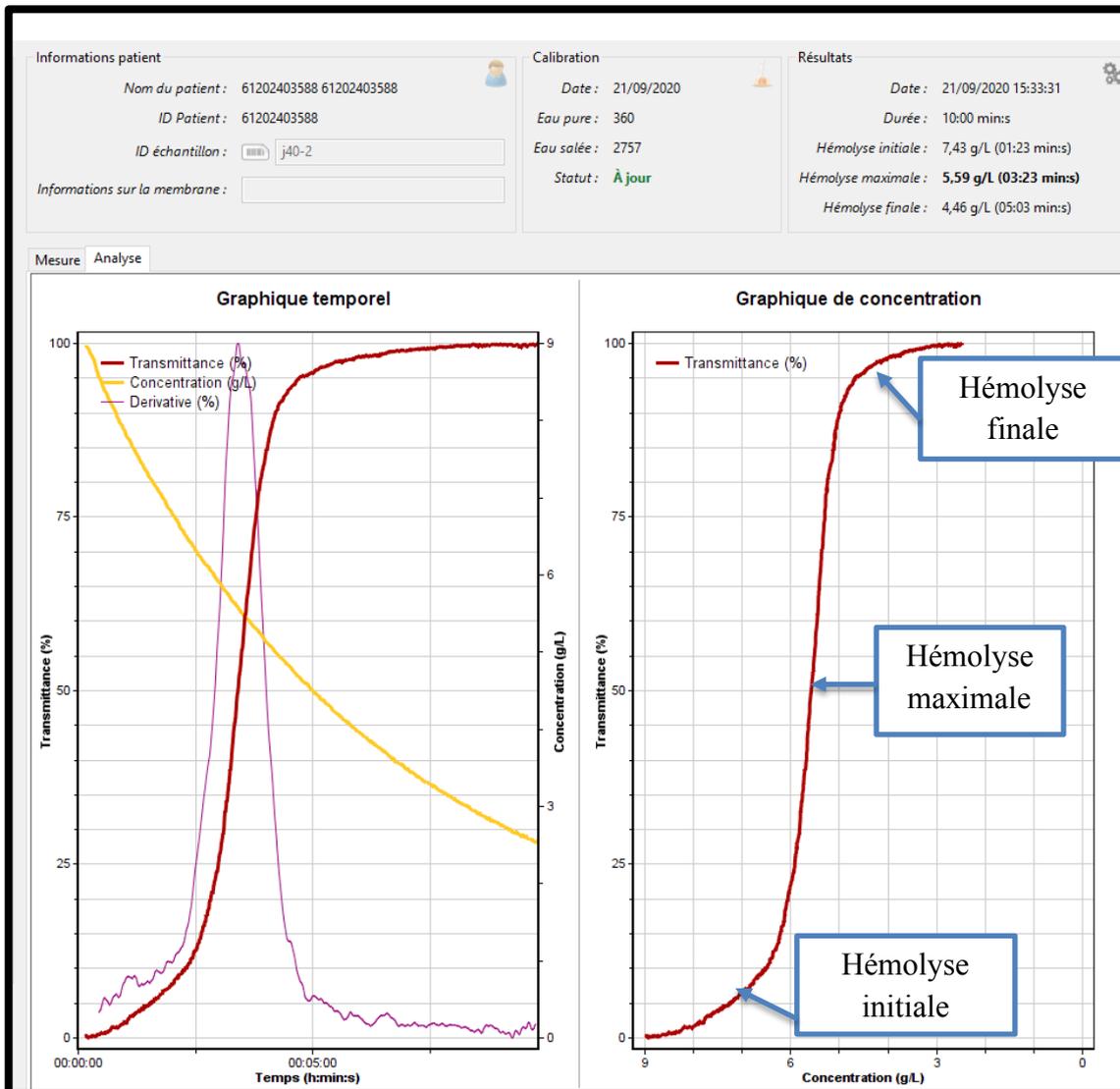


Figure 34 : Schéma de l'Osmocells® [63]

Les méthodes décrites dans la littérature pour étudier la fragilité osmotique au cours du stockage utilisent des hémolyses brutales, à la différence de l'Osmocells® qui provoque une hémolyse progressive. Cet automate apporte plusieurs avantages par rapport aux méthodes décrites précédemment :

- ✓ L'analyse ne nécessite qu'une faible quantité de sang ( $10\mu\text{L}$ )
- ✓ Gain de temps : méthode automatisée et rapide. Les résultats sont obtenus en seulement 10-15 minutes. Analyse facilement réalisable en laboratoire de routine.
- ✓ Gain de précision par rapport aux autres techniques :
  - Du point de vue des courbes d'hémolyse : les anciennes méthodes n'utilisent pas beaucoup de points de mesure pour tracer les courbes d'hémolyse (les premières méthodes utilisaient du papier millimétré), l'hémolyse pouvait même être déterminée visuellement.
  - Du point de vue du suivi de l'hémolyse du globule rouge. En effet, la dialyse permet une diminution progressive de la tonicité du milieu, l'érythrocyte gonfle progressivement jusqu'à atteindre le volume critique puis éclater. L'hémolyse est enregistrée en continu en fonction de la concentration de NaCl jusqu'au point de rupture du globule rouge. L'Osmocells® permet d'obtenir l'hémolyse initiale, l'hémolyse maximale (MCF) et l'hémolyse finale.

Les résultats apparaissent sous forme de courbe d'hémolyse en fonction de la concentration de NaCl au cours du temps (figure 35).



**Figure 35 : Courbes d'hémolyse de l'Osmocells®**

La partie gauche de la figure 34 illustre le graphique temporel qui comprend 3 courbes : une courbe jaune qui correspond à la concentration en NaCl mesurée par conductance, une courbe rouge qui correspond à la transmission lumineuse et une courbe rose qui correspond à une dérivée. Le graphique de concentration (partie droite) illustre la courbe d'hémolyse qui correspond au pourcentage d'hémolyse en fonction de la concentration en NaCl.

Les hémolyses initiales, maximales et finales correspondent respectivement à la concentration de NaCl responsable de 4%, 50% et 96% d'hémolyse des globules rouges.

Dans une étude préliminaire de preuve de concept, les valeurs de référence de la résistance osmotique ont été réalisées sur 40 donneurs sains (tableau VI) [63].

**Tableau VI: Valeurs de références issues de l'étude d'après [63]**

Valeurs de référence	Concentration en NaCl (g/L)
Hémolyse initiale	4,41-5,19*
Hémolyse maximale (MCF)	3,95-4,83*
Hémolyse finale	3,12-4,13*

\* Ces valeurs étant issues d'une étude pilote et sont donc données à titre indicatif, les bornes de référence sont susceptibles en effet d'avoir évolué (nombreuses calibrations et mises à jour logicielles de l'automate) d'autant plus que les méthodes de calculs se sont affinées depuis cette étude.

**c) Planning des manipulations (tableau VII)**

**Tableau VII: Planning des manipulations**

	Nombre de poches (CGR)	J0	J1	J20	J40
Première série	5	26/02	27/02	Annulé*	Annulé*
Deuxième série	5	11/03	12/03	Annulé*	Annulé*
Troisième série	3	12/08	13/08	01/09	21/09
Quatrième série	6	2/09	3/09	22/09	12/10

\* Les J20 et J40 des deux premières séries n'ont pas pu être réalisés en raison des conditions sanitaires liées au COVID-19 (arrêt des analyses non prioritaires par l'EFS).

## II. Résultats

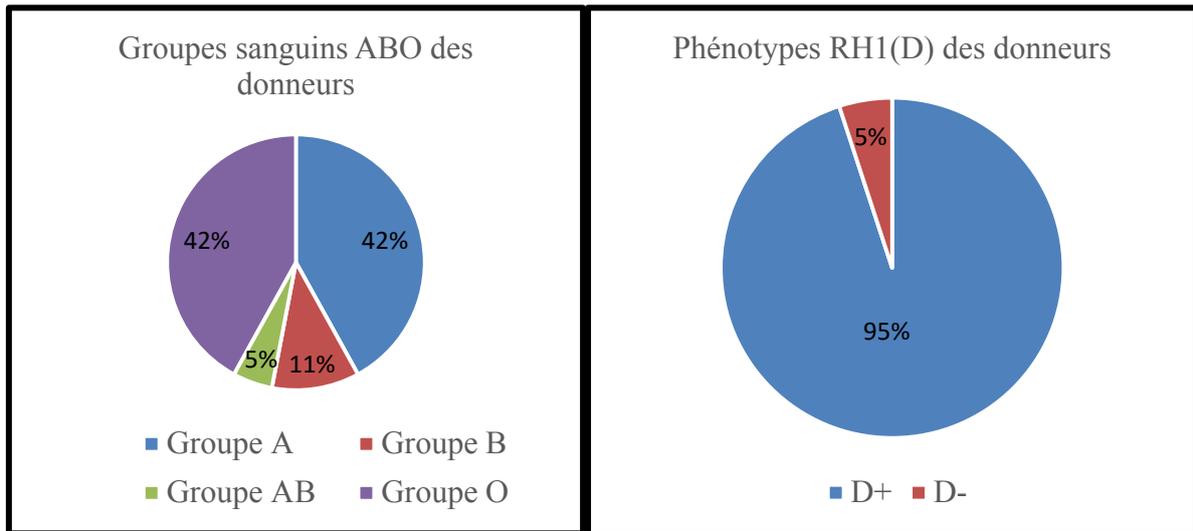
### 1. Caractéristiques des donneurs (tableau VIII)

Tableau VIII : Caractéristiques des donneurs

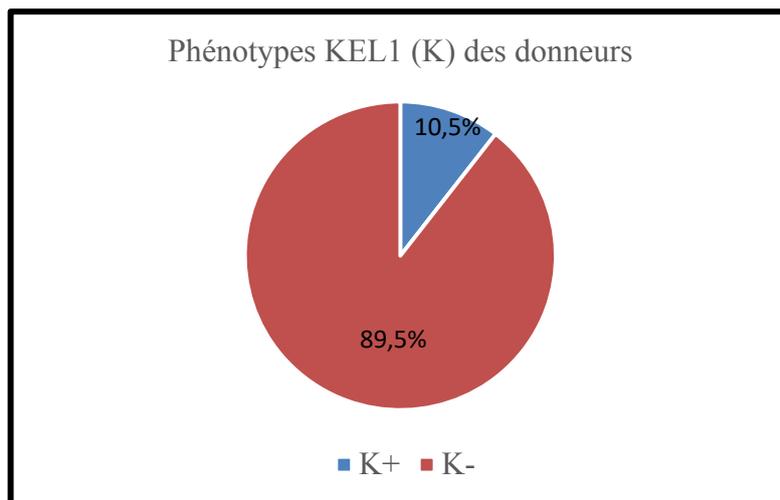
CGR	Age (années)	Sexe	Groupe sanguin	Hémoglobine (g/dL)
N°1	20	Femme	B + D+ C+ E- c- e+ K-	13,9
N°2	24	Femme	A + D+ C+ E- c- e+ K-	13,8
N°3	63	Homme	B + D+ C+ E+ c+ e+ K-	13,3
N°4	43	Homme	O + D+ C+ E+ c+ e+ K-	16,3
N°5	27	Homme	A + D+ C+ E- c+ e+ K+	14,7
N°6	49	Homme	A + D+ C+ E- c- e+ K-	15,1
N°7	54	Homme	O + D+ C+ E- c+ e+ K-	15,6
N°8	23	Homme	A + D+ C+ E- c- e+ K-	15,2
N°9	25	Femme	O + D+ C+ E- c+ e+ K-	12,7
N°10	51	Homme	A + D+ C+ E- c- e+ K-	16,9
N°11	22	Femme	A - D- C- E- c+ e+ K-	13,4
N°12	49	Homme	O + D+ C+ E- c- e+ K-	14,5
N°13	24	Homme	O + D+ C+ E- c+ e+ K+	14,5
N°14	23	Femme	O + D+ C+ E- c+ e+ K-	13,2
N°15	21	Femme	O + D+ C+ E- c- e+ K-	14,3
N°16	25	Femme	A + D+ C+ E+ c+ e+ K-	13,3
N°17	49	Homme	AB + D+ C+ E- c+ e+ K-	15,4
N°18	23	Femme	O + D+ C- E+ c+ e+ K-	13,0
N°19	21	Femme	A + D+ C+ E- c- e+ K-	13,4

Les caractéristiques des donneurs sont représentées dans le tableau ci-dessus (tableau VIII). La médiane d'âge des donneurs de notre étude est de 25 ans. Les hommes représentent 53% des dons contre 47% de femmes. L'hémoglobine médiane est de 14,3 g/dL (15,2 g/dL chez les hommes vs 13,4 g/dL chez les femmes).

Les répartitions des groupes sanguins ABO ainsi que les phénotypes RH 1 (D) et KEL 1 (figures 36 et 37) sont représentées sur les figures ci-dessous :

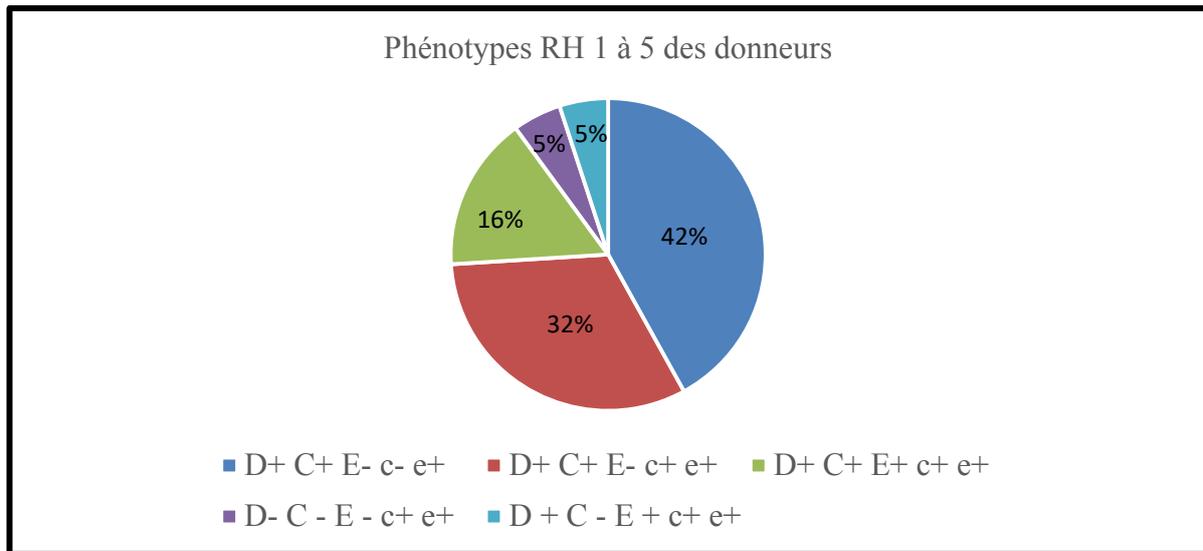


**Figure 36: Groupes sanguins et phénotypes RH 1 (D) des donneurs**



**Figure 37 : Phénotypes KEL1 (K) des donneurs**

La répartition détaillée des phénotypes Rhésus 1 à 5 est détaillée ci-dessous (figure 38) :



**Figure 38: Phénotype Rhésus (1 à 5) des donneurs**

Les donneurs sont représentatifs de la population générale. En effet, la population générale est composée à 45% de groupe A, 43% de groupe O, 9% de groupe B, 3% de groupe AB et la majorité des individus sont RH :1 (85%) et KEL : -1 (91%). Les phénotypes les plus courants du système Rhésus sont par ordre de fréquence les suivants : D+, C+, E-, c+, e+ ; D+, C+, E-, c-, e+ ; D+, C+, E+, c+, e+ ; D-, C-, E-, c+, e+ ; D+, C-, E+, c+, e+.

## 2. Résultats

### a) Fragilité osmotique des tubes EDTA à J0 (tableaux IX)

Tableau IX: Fragilité osmotique des tubes EDTA à J0 (n=19)

	Hémolyse initiale (g/L)	Hémolyse maximale (MCF, g/L)	Hémolyse finale (g/L)
<b>EDTA n°1</b>	4,35	2,89	2,20
<b>EDTA n°2</b>	5,15	2,98	2,09
<b>EDTA n°3</b>	4,28	3,09	2,51
<b>EDTA n°4</b>	6,96	3,67	3,04
<b>EDTA n°5</b>	5,36	3,56	2,97
<b>Médiane 1<sup>ère</sup> série</b>	<b>5,15</b>	<b>3,09</b>	<b>2,51</b>
<b>EDTA n°6</b>	5,84	4,49	3,62
<b>EDTA n°7</b>	6,42	5,25	4,58
<b>EDTA n°8</b>	6,35	4,61	4,02
<b>EDTA n°9</b>	6,16	4,8	4,16
<b>EDTA n°10</b>	6,63	4,63	3,95
<b>Médiane 2<sup>ème</sup> série</b>	<b>6,35</b>	<b>4,63</b>	<b>4,02</b>
<b>EDTA n°11</b>	6,13	4,79	4,15
<b>EDTA n°12</b>	6,39	4,81	4,08
<b>EDTA n°13</b>	6,11	4,93	4,25
<b>Médiane 3<sup>ème</sup> série</b>	<b>6,13</b>	<b>4,87</b>	<b>4,15</b>
<b>EDTA n°14</b>	5,97	4,51	3,66
<b>EDTA n°15</b>	6,48	5,18	4,13
<b>EDTA n°16</b>	5,63	4,75	3,92
<b>EDTA n°17</b>	6,11	4,72	3,91
<b>EDTA n°18</b>	6,19	4,75	4,13
<b>EDTA n°19</b>	6,36	4,77	4,14
<b>Médiane 4<sup>ème</sup> série</b>	<b>6,15</b>	<b>4,75</b>	<b>4,03</b>
<b>Médiane toutes séries</b>	<b>6,13</b>	<b>4,68</b>	<b>3,95</b>
<b>Intervalle interquartile [Q1-Q3]</b>	<b>[5,74-6,38]</b>	<b>[3,88-4,79]</b>	<b>[3,33-4,14]</b>
Ecart-type	0,71	0,76	0,73

b) Fragilité osmotique des CGR à J+1 (tableaux X et XI)

Tableau X: Fragilité osmotique des CGR à J+1 (n=19)

	Hémolyse initiale (g/L)	Hémolyse maximale (MCF, g/L)	Hémolyse finale (g/L)
<b>CGR n°1</b>	7,23	5,07	4,33
<b>CGR n°2</b>	6,37	4,95	4,23
<b>CGR n°3</b>	6,84	5,07	4,25
<b>CGR n°4</b>	6,51	4,91	4,11
<b>CGR n°5</b>	6,02	4,83	4,14
<b>Médiane 1<sup>ère</sup> série</b>	<b>6,51</b>	<b>4,95</b>	<b>4,23</b>
<b>CGR n°6</b>	7,07	5,09	3,9
<b>CGR n°7</b>	6,71	5,21	4,4
<b>CGR n°8</b>	7,96	5,66	4,77
<b>CGR n°9</b>	6,96	5,09	4,24
<b>CGR n°10</b>	6,65	5,32	4,47
<b>Médiane 2<sup>ème</sup> série</b>	<b>6,96</b>	<b>5,21</b>	<b>4,4</b>
<b>CGR n°11</b>	5,79	4,59	3,97
<b>CGR n°12</b>	6,61	4,83	4,1
<b>CGR n°13</b>	6,24	4,81	4,11
<b>Médiane 3<sup>ème</sup> série</b>	<b>6,24</b>	<b>4,81</b>	<b>4,1</b>
<b>CGR n°14</b>	6,07	4,85	3,81
<b>CGR n°15</b>	6,34	5,03	4,19
<b>CGR n°16</b>	7,57	5,33	4,34
<b>CGR n°17</b>	7,22	5,15	4,10
<b>CGR n°18</b>	7,27	5,38	4,62
<b>CGR n°19</b>	7,01	5,31	4,47
<b>Médiane 4<sup>ème</sup> série</b>	<b>7,12</b>	<b>5,23</b>	<b>4,27</b>
<b>Médiane toutes séries</b>	<b>6,71</b>	<b>5,07</b>	<b>4,23</b>
<b>Intervalle interquartile [Q1-Q3]</b>	<b>[6,36-7,15]</b>	<b>[4,88-5,26]</b>	<b>[4,11-4,37]</b>
<b>Ecart-type</b>	0,55	0,24	0,23

Tableau XI : Variation de l'hémolyse osmotique J0 vs J1 (n=19)

	Hémolyse initiale (g/L)	Hémolyse maximale (MCF, g/L)	Hémolyse finale (g/L)
<b>Médiane J0</b>	6,13	4,68	3,95
<b>Médiane J1</b>	6,71	5,07	4,23
<b>Δ J0/J1 (%)</b>	<b>9,5</b>	<b>8,3</b>	<b>7,1</b>

Nous observons une augmentation des trois paramètres (hémolyse initiale, hémolyse maximale et hémolyse finale) à J+1, c'est-à-dire une augmentation de la fragilité osmotique à l'issue du processus de préparation des CGR. L'hémolyse initiale semble être la plus impactée parmi les trois paramètres d'hémolyse.

A noter que la troisième série ne semble pas impactée car nous n'observons pas de variation entre J0 et J+1. Nous discuterons de ces résultats dans la partie discussion.

### c) Fragilité osmotique des CGR à J+20 de stockage (tableaux XII)

**Tableau XII: Fragilité osmotique des CGR à J+20 (n=9)**

	<b>Hémolyse initiale (g/L)</b>	<b>Hémolyse maximale (MCF, g/L)</b>	<b>Hémolyse finale (g/L)</b>
<b>CGR n°11</b>	7,07	5,40	4,43
<b>CGR n°12</b>	7,06	4,80	3,94
<b>CGR n°13</b>	6,56	4,98	4,12
<b>Médiane 3<sup>ème</sup> série</b>	<b>7,06</b>	<b>4,98</b>	<b>4,12</b>
<b>CGR n°14</b>	6,91	5,11	4,03
<b>CGR n°15</b>	6,38	4,64	3,66
<b>CGR n°16</b>	6,99	4,69	3,75
<b>CGR n°17</b>	6,60	4,94	3,91
<b>CGR n°18</b>	7,54	5,02	4,13
<b>CGR n°19</b>	6,50	4,88	3,86
<b>Médiane 4<sup>ème</sup> série</b>	<b>6,76</b>	<b>4,91</b>	<b>3,89</b>
<b>Médiane séries 3 et 4</b>	<b>6,91</b>	<b>4,94</b>	<b>3,94</b>
<b>Intervalle interquartile [Q1-Q3]</b>	<b>[6,56-7,06]</b>	<b>[4,8-5,02]</b>	<b>[3,86-4,12]</b>
<b>Ecart-type</b>	0,37	0,23	0,23

d) Fragilité osmotique des CGR à J+40 de stockage (tableaux XIII, XIV et XV)

**Tableau XIII: Fragilité osmotique des CGR à J+40 (n=9)**

	<b>Hémolyse initiale (g/L)</b>	<b>Hémolyse maximale (MCF, g/L)</b>	<b>Hémolyse finale (g/L)</b>
<b>CGR n°11</b>	6,96	5,16	3,94
<b>CGR n°12</b>	6,66	5,10	4,04
<b>CGR n°13</b>	6,98	5,14	3,69
<b>Médiane 3<sup>ème</sup> série</b>	<b>6,96</b>	<b>5,14</b>	<b>3,94</b>
<b>CGR n°14</b>	7,59	5,28	4,09
<b>CGR n°15</b>	7,79	5,25	4,22
<b>CGR n°16</b>	7,68	5,14	4,07
<b>CGR n°17</b>	7,79	5,44	4,30
<b>CGR n°18</b>	8,02	5,53	4,40
<b>CGR n°19</b>	7,10	5,56	3,86
<b>Médiane 4<sup>ème</sup> série</b>	<b>7,74</b>	<b>5,36</b>	<b>4,16</b>
<b>Médiane séries 3 et 4</b>	<b>7,59</b>	<b>5,25</b>	<b>4,07</b>
<b>Intervalle interquartile [Q1-Q3]</b>	<b>[6,98-7,79]</b>	<b>[5,14-5,44]</b>	<b>[3,94-4,22]</b>
<b>Ecart-type</b>	0,48	0,18	0,22

- Résumé des données de la troisième et de la quatrième série (n=9, tableau XIV)

**Tableau XIV : Résumé des résultats de la troisième et de la quatrième série**

	<b>Hémolyse initiale (g/L)</b>	<b>Hémolyse maximale (MCF, g/L)</b>	<b>Hémolyse finale (g/L)</b>
<b>Médiane J0</b>	6,13	4,76	4,13
<b>Médiane J1</b>	6,61	5,03	4,11
<b>Médiane J20</b>	6,91	4,94	3,94
<b>Médiane J40</b>	7,59	5,25	4,07
<b>Δ J0/J1 (%)</b>	<b>7,8</b>	<b>5,7</b>	<b>-0,5</b>
<b>Δ J0/J20 (%)</b>	<b>12,7</b>	<b>3,8</b>	<b>-4,6</b>
<b>Δ J1/J20 (%)</b>	<b>4,5</b>	<b>-1,8</b>	<b>-4,1</b>
<b>Δ J20/J40 (%)</b>	<b>9,8</b>	<b>6,3</b>	<b>3,3</b>
<b>Δ J0/J40 (%)</b>	<b>23,8</b>	<b>10,3</b>	<b>-1,5</b>
<b>Δ J1/J40 (%)</b>	<b>14,8</b>	<b>4,4</b>	<b>-1</b>

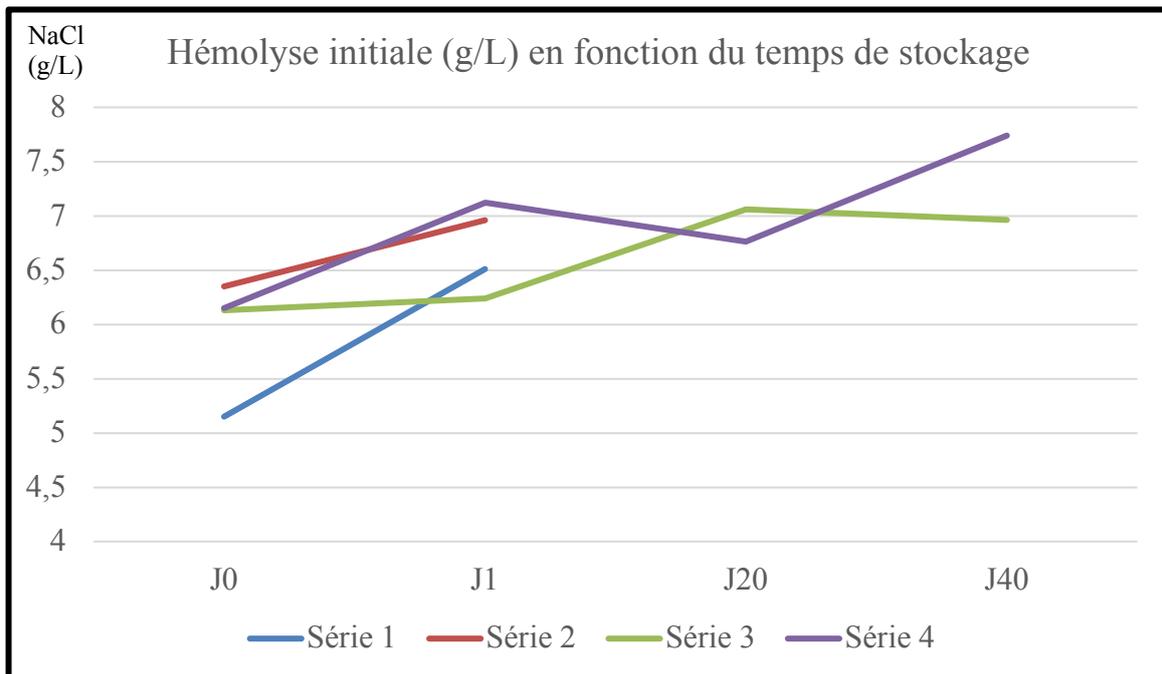
Nous avons résumé les variations des différentes hémolyses des 4 séries dans le tableau ci-dessous (tableau XV) :

**Tableau XV : Résumé des résultats des séries**

	Hémolyse initiale (g/L)				Hémolyse maximale (MCF, g/L)				Hémolyse finale (g/L)			
	J0	J1	J20	J40	J0	J1	J20	J40	J0	J1	J20	J40
<b>Médiane 1<sup>ère</sup> série</b>	5,15	6,51	/	/	3,09	4,95	/	/	2,51	4,23	/	/
<b>Médiane 2<sup>ème</sup> série</b>	6,35	6,96	/	/	4,63	5,21	/	/	4,02	4,4	/	/
<b>Médiane 3<sup>ème</sup> série</b>	6,13	6,24	7,06	6,96	4,87	4,81	4,98	5,14	4,15	4,1	4,12	3,94
<b>Médiane 4<sup>ème</sup> série</b>	6,15	7,12	6,76	7,74	4,75	5,23	4,91	5,36	4,03	4,27	3,89	4,16

**e) Variation de l'hémolyse au cours du stockage**

➤ Hémolyse initiale (figure 39)



**Figure 39 : Evolution de l'hémolyse initiale au cours du stockage**

➤ Hémostolyse maximale (figure 40)

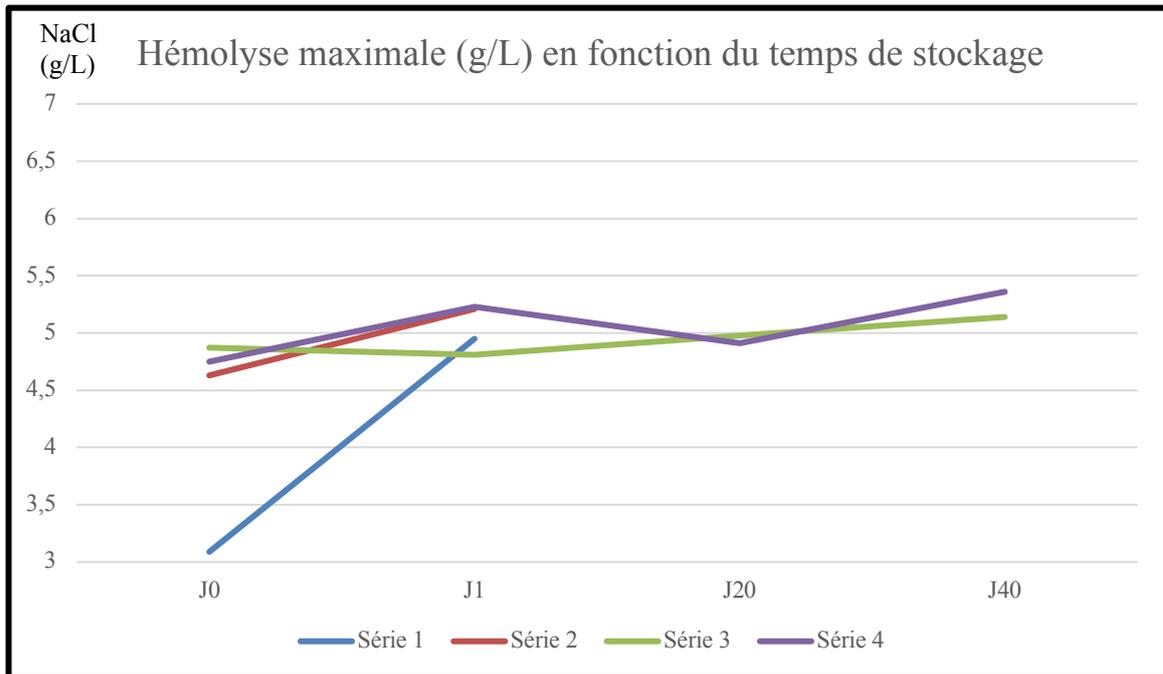


Figure 40 : Evolution de l'hémostolyse maximale au cours du stockage

➤ Hémostolyse finale (figure 41)

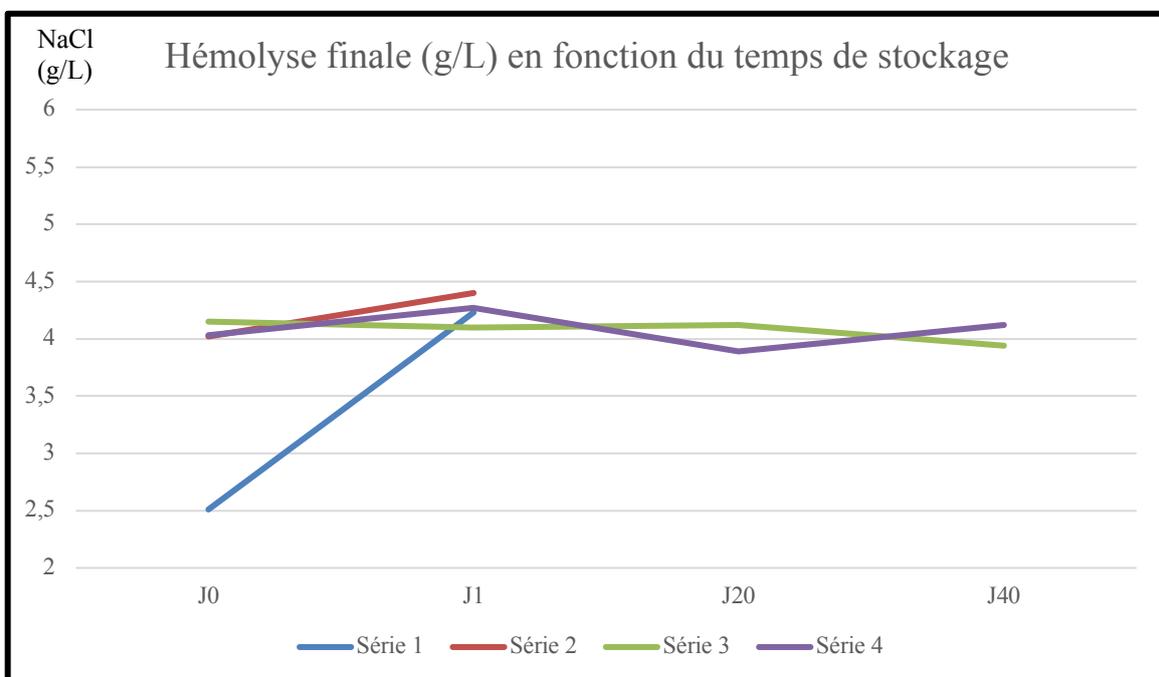


Figure 41 : Evolution de l'hémostolyse finale au cours du stockage

➤ Cas particulier de l'hémolyse maximale (MCF)

Les données de la littérature utilisent la MCF comme paramètre pour étudier la fragilité osmotique au cours du stockage des CGR. Nous avons ainsi détaillé nos données concernant la MCF pour chaque série (figures 42, 43, 44 et 45).

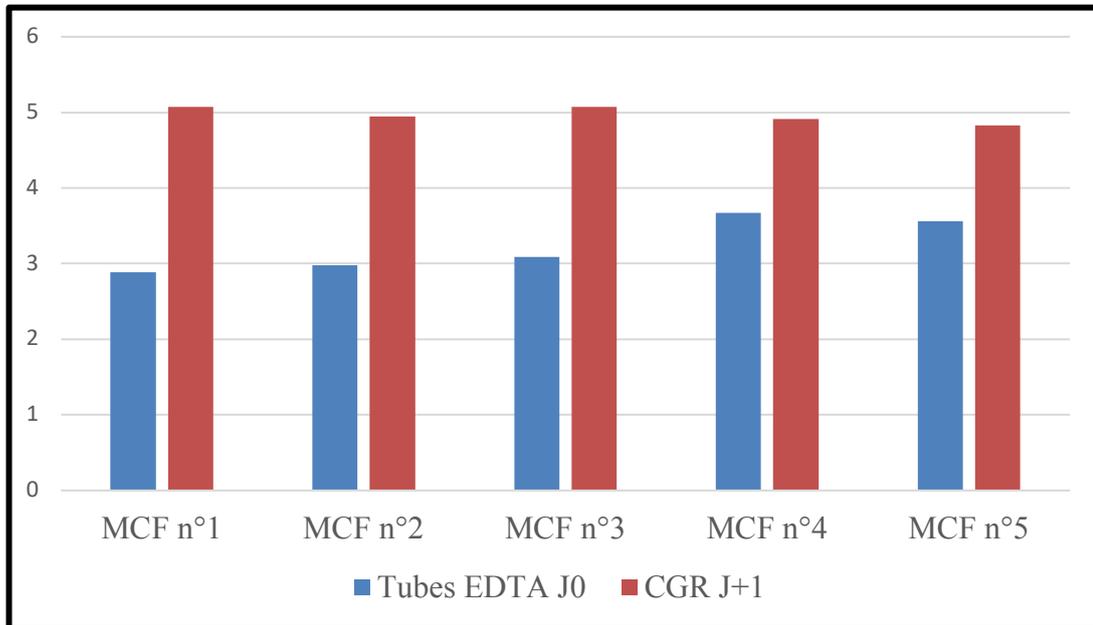


Figure 42 : Evolution de la MCF à J0 vs J1 de la première série

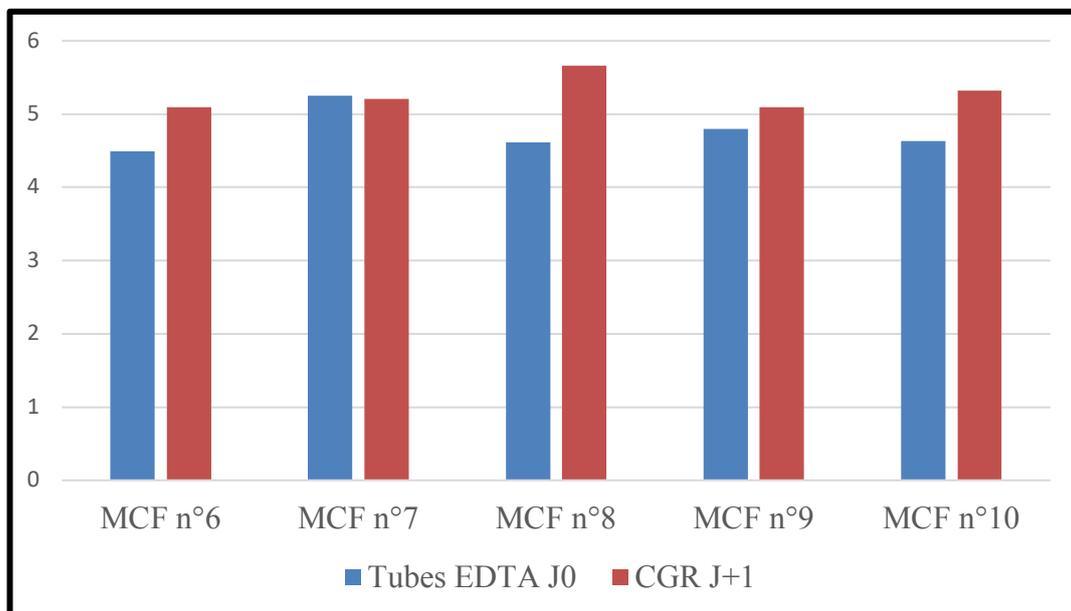
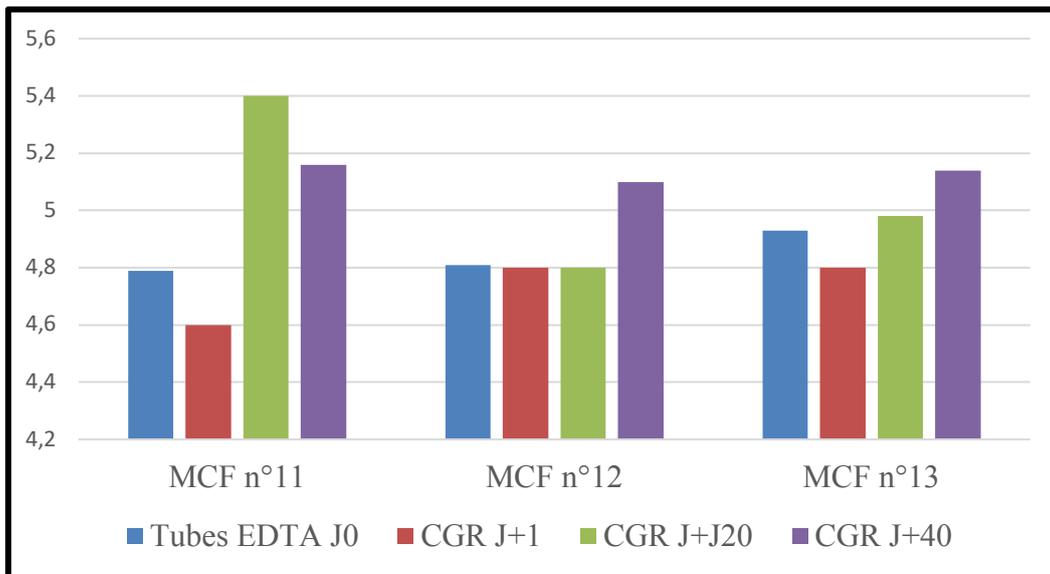
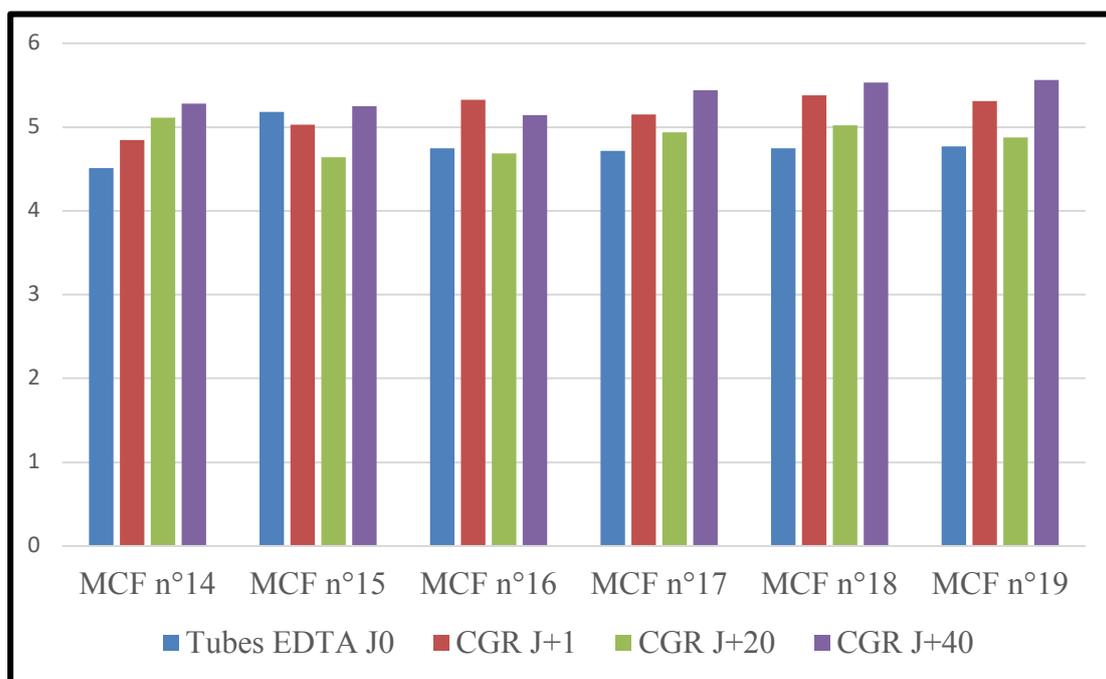


Figure 43 : Evolution de la MCF à J0 vs J1 de la deuxième série



**Figure 44 : Evolution de la MCF de la troisième série**



**Figure 45 : Evolution de la MCF de la quatrième série**

Nous remarquons que la quatrième série a la particularité de ne pas présenter une plus grande MCF à J20 par rapport à J1, excepté pour le CGR n°14. Nous ne pouvons pas exclure un problème analytique.

Nos données des 4 séries montrent que la MCF varie au cours du stockage. En effet, elle augmente progressivement aux différents temps du stockage. Certains CGR semblent surtout être impactés à J1 (dès la sortie du plateau technique de préparation).



### III. Discussion

Pour étudier la fragilité osmotique des CGR au cours du stockage, nous avons utilisé plus particulièrement les données de l'hémolyse maximale (MCF) obtenues avec l'Osmocells®, étant donné que la majorité des données de la littérature utilisent également ce paramètre pour étudier la fragilité osmotique. Pour rappel, plus elle est élevée, plus les érythrocytes hémolysent à une concentration sodique élevée. En d'autres termes, une augmentation de la MCF est le signe d'une plus grande fragilité osmotique érythrocytaire.

Nos résultats ont mis en évidence une plus grande fragilité osmotique à J1 par rapport à J0 (excepté pour la troisième série) mais aussi au cours du stockage. Il semblerait donc que le processus de préparation influence la fragilité osmotique des globules rouges, de même que le stockage.

Cette partie sera axée sur une discussion autour des lésions issues de la préparation puis sur les lésions liées au stockage.

#### 1. Lésions issues de la préparation

Les premiers résultats des manipulations ont mis en évidence une plus grande fragilité osmotique des CGR le premier jour de stockage par rapport aux tubes EDTA le jour même du don. En effet, nous observons une variation de 8,3% entre les médianes MCF à J0 et MCF à J1. Même si les milieux des tubes EDTA et des CGR ne sont pas strictement comparables, nous pouvons supposer que les globules rouges deviennent plus fragiles à l'issue du processus de préparation des CGR puisque leur fragilité osmotique est augmentée dès leur sortie du plateau de production de l'EFS. Cela nous laisse penser que les érythrocytes seraient impactés par le processus de fabrication des CGR.

Cependant, la troisième série ne semble pas être impactée par le processus de préparation étant donné que nous n'observons pas de variation d'hémolyse entre J0 et J1. Nous pouvons formuler plusieurs hypothèses pour l'expliquer :

- Cela pourrait être dû à un problème analytique lié à la série
- Ou à une variabilité de préparation des CGR
- Ou encore à une variabilité de réponse des globules rouges. Cette hypothèse paraît peu probable puisque les trois donneurs se comportent de la même manière à J1.

Plusieurs données de la littérature exposent le fait suivant : le processus de préparation des CGR impacterait les érythrocytes. En effet, *in vivo* les globules rouges sont en équilibre avec leur environnement. Dès la collection du don, le traitement *ex vivo* du sang total affecte très probablement les érythrocytes [145] étant donné que leur milieu extracellulaire se trouve modifié [146].

En effet, au cours des différentes étapes de préparation du sang en CGR, les globules rouges sont soumis à de nouvelles conditions, telles qu'une modification de pH, une mise en suspension dans la solution anticoagulante et dans la solution de conservation, une variation de température ainsi qu'un stress mécanique (centrifugations), ce qui pourrait affecter la fragilité d'une partie des érythrocytes [145].

L'hémolyse du sang total fraîchement recueilli est normalement inférieure à 0,02% [147]. Pour être conforme à la réglementation, l'hémolyse des CGR doit être inférieure à 0,8% à la fin du stockage [4]. L'hémolyse augmente progressivement au cours du stockage mais d'après nos résultats, elle pourrait également apparaître au cours du processus de préparation des CGR suite à une fragilisation des globules rouges. C'est l'hypothèse de plusieurs auteurs de la littérature.

Au cours de chaque étape du processus de préparation des CGR, les globules rouges peuvent être exposés à un stress, notamment mécanique, qui pourrait altérer leur fonctionnalité et leur intégrité, conduisant à leur hémolyse et à une déformabilité réduite [12, 147]. Prenons chaque étape du processus de préparation et étudions leur impact potentiel sur la fragilisation des globules rouges.

#### **a) Variation de la qualité des dispositifs de prélèvements [10, 148, 149]**

L'hémolyse au cours de la préparation peut apparaître du fait d'une mauvaise qualité des dispositifs stériles notamment une rugosité anormale ou encore à cause de l'obstruction de tubulures qui pourraient provoquer des lésions érythrocytaires voire à une hémolyse.

#### **b) Solution anticoagulante [12, 150]**

Le sang collecté est immédiatement mis en suspension dans une solution anticoagulante (Citrates-Phosphate-Dextrose le plus souvent). Cette étape provoque les premiers changements chimiques et biologiques du sang total. De plus, la mise en suspension peut provoquer un stress mécanique. Il en est de même pour la mise en suspension dans la solution de conservation.

#### **c) Centrifugation, séparation [10-12, 147-156]**

##### **➤ Hémolyse**

Les globules rouges sont soumis à un stress mécanique au cours de la centrifugation à haute vitesse de la poche de sang [12]. Ce stress peut fragiliser les globules rouges et causer l'hémolyse des plus fragiles et des plus âgés [147, 150].

Saini *et al* [11] ont mis en évidence que l'hémolyse des CGR à l'issue du processus de préparation est supérieure à l'hémolyse des CGR avant préparation (figure 47), ce qui illustre la fragilisation des globules rouges au cours du processus de préparation des CGR. En effet, l'hémolyse de 160 CGR varie de 38 à 54% entre J0 (pré-préparation) et J1 (post-préparation).

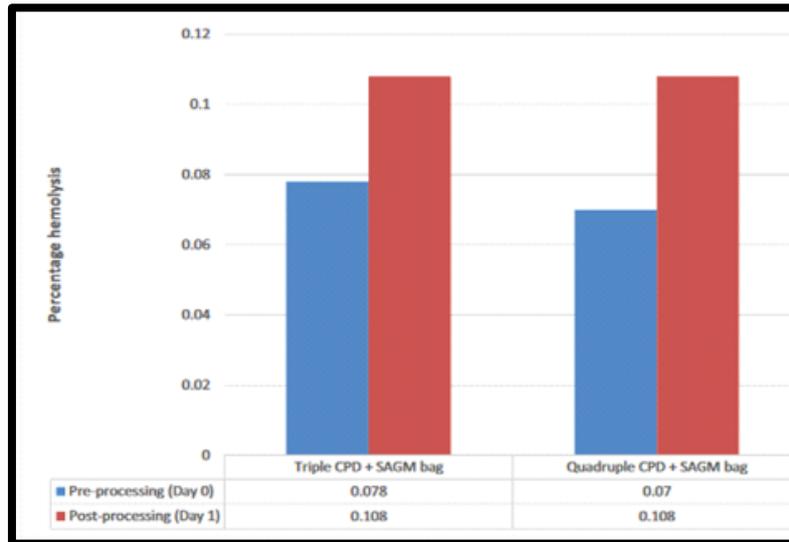


Figure 47 : Hémolyse pré et post-préparation des CGR [11]

Shastry *et al* [152] ont quant à eux montré que la force de centrifugation induit un stress qui a un rôle significatif dans l'hémolyse des globules rouges. En effet, l'hémolyse à J0 d'un CGR ayant subi une plus forte vitesse de centrifugation est supérieure par rapport à des centrifugations plus douces. La quantité de globules rouges endommagés pendant la centrifugation dépend de la vitesse de rotation mais aussi de la durée [101].

➤ Déformabilité

Le stress mécanique peut également altérer la déformabilité des CGR via des dommages membranaires [147, 101, 153]. Dans la figure ci-dessous, Barshtein *et al* [13] a comparé la déformabilité d'une poche avant préparation et d'une poche après préparation. Le décalage vers la gauche de la courbe des CGR post-préparation indique un ratio d'élongation réduit (figure 48).

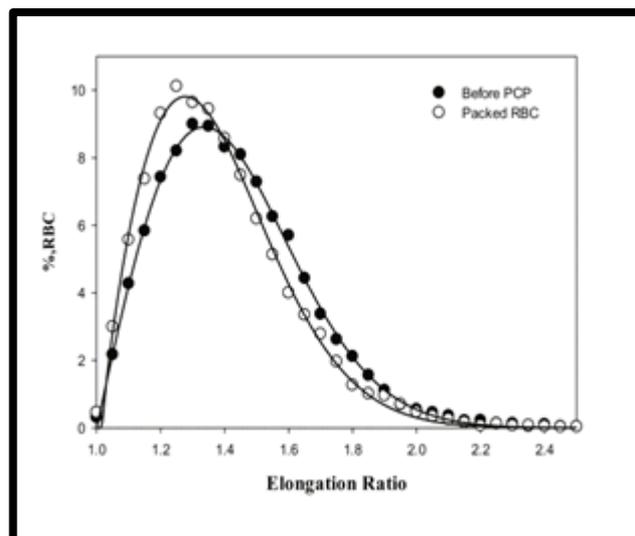


Figure 48 : Ratio d'élongation de CGR pré et post-préparation [13]

#### **d) Filtration**

La filtration du sang n'aurait pas d'impact pas sur les érythrocytes car le stress induit ne serait pas suffisant pour causer la lyse des globules rouges [10, 150].

#### **e) Solution de conservation [10-12, 28]**

Le SAG-M est ajouté rapidement après l'étape de séparation et de déleucocytation. Cette exposition soudaine pourrait être responsable de dommages et de lyse sur les populations les plus fragiles de globules rouges, notamment à cause du changement d'osmolarité rapide (SAG-M hyper osmotique [98]).

#### **f) Variations de la température**

La température de préparation des CGR affecte la stabilité de la membrane. Par exemple, des températures extrêmes telles que +40°C ou +1°C peuvent favoriser l'hémolyse pendant la filtration ou pendant la centrifugation.

#### **g) Variabilité intra et inter donneur [12, 145, 154]**

Pour Barshtein *et al* [13], l'impact de la préparation est déterminé initialement par le statut des globules rouges du donneur. Certaines caractéristiques propres au donneur peuvent influencer la résistance à l'hémolyse (cette partie a été développée précédemment).

Toute étape mal réalisée peut aussi expliquer une hémolyse anormale, notamment lorsque le délai de moins de 24 heures entre la collecte du don et la séparation du sang total n'est pas respecté (des lésions peuvent apparaître à cause des leucocytes encore présents) [12, 145].

Pour résumer, les globules rouges peuvent être exposés à un stress au cours de la préparation des CGR, pouvant conduire à des dommages membranaires voire à la lyse d'une partie des globules rouges.

Nos résultats sont donc cohérents avec la littérature puisque nous avons une augmentation des trois paramètres d'hémolyse entre J0 et le J1. Les CGR semblent donc impactés dès leur processus de préparation.

Dans la figure ci-dessous (figure 49), les facteurs pouvant jouer sur la fragilité des érythrocytes ont été résumés :

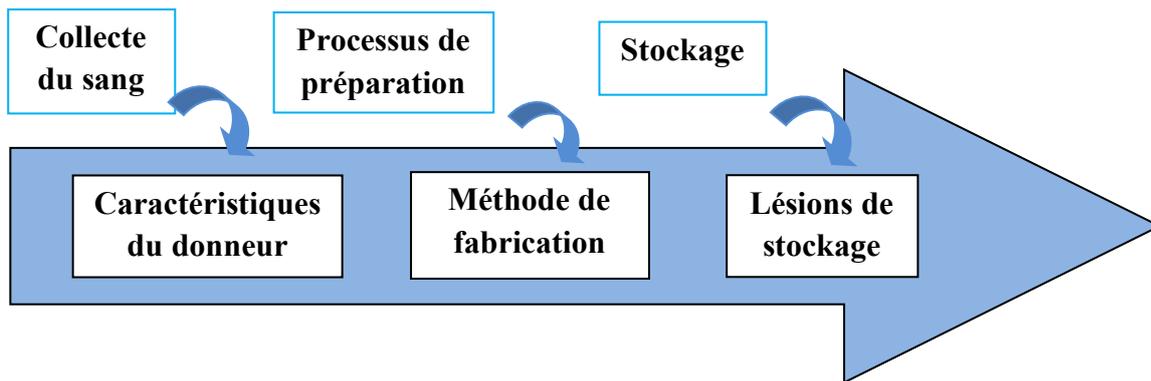


Figure 49 : De la collecte à la délivrance

En plus de la fragilisation des globules rouges suite à la préparation des CGR, des lésions s'ajoutent du fait de leur conservation. C'est ce que nous allons détailler dans le paragraphe suivant.

## 2. Lésions issues du stockage

Comme nous l'avons largement décrit précédemment, les CGR subissent des lésions au cours du stockage qui se traduisent notamment par une fragilité osmotique augmentée.

Nos résultats mettent en évidence :

- Une augmentation progressive de la fragilité osmotique au cours du stockage  
La troisième et la quatrième série montrent une variation de la MCF (médiane) entre J0 et J40 de 10,3% et une variation entre J1 et J40 de 4,4%.
- Certaines poches semblent moins impactées par le stockage que d'autres  
C'est le cas de la quatrième série pour laquelle la MCF n'est pas plus augmentée à J20 par rapport à J1 (problème pré-analytique ?).
- La fragilité osmotique entre J20 et J40 semble relativement stable  
Nous pouvons observer que la MCF est relativement stable entre J20 et J40, la variation allant de 3,2 à 9,2%.

C'est pour cela que les paramètres les plus intéressants à utiliser semblent être l'hémolyse initiale car c'est elle qui présente la plus grande variation, ou encore la MCF. En effet, comparée aux autres paramètres d'hémolyse, l'hémolyse initiale est le paramètre qui semble être le plus

impacté au cours du stockage. De plus, cette hémolyse est souvent corrélée à une hémolyse précoce, donc peut être plus pertinente dans notre objectif. L'hémolyse finale semble moins impactée que les autres paramètres.

Etant donné que certaines poches ne semblent pas être impactées à J1, les temps de stockage à étudier seraient plutôt les J0, J20,  $\Delta$  J0/J20 ou  $\Delta$  J0/J40 afin de s'affranchir de l'absence de variation à J1.

Comme détaillé précédemment, nous pouvons expliquer cette plus grande fragilité osmotique du fait d'une atteinte morphologique (ratio surface/volume diminué) principalement due à l'altération du métabolisme énergétique des érythrocytes (diminution en ATP, acidose, augmentation de la concentration en calcium) ainsi qu'au stress oxydant (attaques oxydatives des protéines structurales).

### 3. Limites de l'étude

Comme toute étude, des limites sont mises en évidence, nous pouvons citer :

- Le nombre de CGR étudié (n=9)

Initialement, nous devions réaliser nos analyses complètes (J0, J1, J20 J40) sur 15 CGR mais en raison de la crise sanitaire COVID-19, des séries ont été annulées au printemps. Ce travail porte ainsi sur un faible nombre de CGR. Il serait donc nécessaire de poursuivre des manipulations sur un plus grand nombre de CGR, notamment afin de conclure sur une éventuelle corrélation entre la fragilité osmotique à J0 et la fragilité osmotique à J40 du stockage.

- Un « effet série » :

Au vu des résultats de la troisième série, nous ne pouvons pas exclure dans nos résultats actuels un « effet série ». En effet, cette série est la seule à ne pas montrer de variation d'hémolyse entre le J0 et le J1. Cette notion renforce la nécessité d'augmenter les effectifs de l'étude.

- Comparer nos données avec les contrôles qualités d'hémolyse de l'EFS :

Il serait intéressant de comparer nos données de l'Osmocells® (hémolyses initiales, maximales et finales et/ou des delta entre les différents de stockage) avec l'hémolyse mesurée officiellement par l'EFS à la fin du stockage, dans le but de savoir si la poche est conforme et apte à être délivrée.

## Conclusion générale

Le but de notre travail était d'étudier l'impact du stockage sur la fragilité osmotique des CGR mais également l'impact du processus de préparation des CGR.

Nous avons montré grâce à la fragilité osmotique que la préparation des CGR impacte la fragilité des globules rouges, de même que le stockage. Certaines poches semblent toutefois moins impactées que d'autres par le processus de préparation et par le stockage.

L'Osmocells®, de par sa facilité d'utilisation et par sa rapidité dans le délai de rendu de résultat, pourrait être utilisé en routine en contrôle de qualité soit pour dépister les donneurs ayant une fragilité osmotique augmentée le jour même du don, ce qui pourrait correspondre à des CGR avec des capacités de stockage diminuées ; soit pour détecter une fragilité osmotique augmentée à l'issue de l'étape initiale de préparation.

Les CGR issus des donneurs ayant une plus grande fragilité osmotique pourraient être identifiés comme à « délivrance rapide » possible afin d'éviter que les lésions du stockage fragilisent plus encore les érythrocytes. Pour aller plus loin, ces CGR pourraient même être à éviter pour certaines populations fragiles comme les nouveau-nés par exemple.

Il serait donc intéressant de détecter au plus tôt les donneurs aux capacités de stockage « plus limitées », conduisant à des CGR de « moins bonne qualité » et qui pourraient être moins efficaces (survie *in vitro* et post-transfusionnelle plus faibles).

Actuellement, le taux d'hémolyse à la fin du stockage est l'un des seuls paramètres de contrôle qualité de l'EFS représentatifs des lésions de stockage. Etudier la fragilité osmotique des CGR en fin de stockage pourrait donc être une perspective d'avenir dans le contrôle qualité des CGR. Outre la nécessité d'augmenter les effectifs, cette étude devra se prolonger par la comparaison du taux d'hémolyse à l'issue de la conservation par l'EFS avec les paramètres fournis par l'Osmocells®.

Pour conclure, l'Osmocells® nous a permis dans cette première étude de conclure à un impact probable et attendu (au vu de la littérature) du processus de préparation des CGR mais aussi du stockage sur la fragilité osmotique des CGR, ce qui confirme l'intérêt potentiel de cet appareil pour le suivi des culots érythrocytaires.

## Bibliographie

1. Santé publique France. Surveillance épidémiologique des donneurs de sang en France 1992–2018 [Internet], disponible sur <https://www.santepubliquefrance.fr/don-de-sang/donnees/#tabs> (consulté le 25/11/19).
2. ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) 16<sup>ème</sup> Rapport national d'hémovigilance 2018. Décembre 2019 [Internet], disponible sur [https://www.ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/L-ANSM-publie-le-rapport-d-activite-hemovigilance-2018/\(language\)/fre-FR](https://www.ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/L-ANSM-publie-le-rapport-d-activite-hemovigilance-2018/(language)/fre-FR) (consulté le 13/11/19).
3. Muller JY, Lefrère JJ. Utilisation des produits sanguins. Lavoisier Ed. Paris, 2012, pp 12-21, 25-32, 97-106.
4. HAS (Haute Autorité de Santé) Transfusion de globules rouges homologues : produits, indications, alternatives. Recommandations pour la pratique clinique. Novembre 2014 [Internet], disponible sur [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-02/transfusion\\_de\\_globules\\_rouges\\_homologues\\_-\\_produits\\_indications\\_alternatives\\_-\\_recommandations.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-02/transfusion_de_globules_rouges_homologues_-_produits_indications_alternatives_-_recommandations.pdf) (consulté le 10/09/19)
5. Lefrère JJ, Schved JF. Transfusion en hématologie. John Libbey Eurotext Ed. Montrouge, 2010, pp 1-38.
6. Beauplet A, Courbil R, Ouazan JM. Médecine transfusionnelle : le modèle français. John Libbey Eurotext Ed. Montrouge, 2013, pp 49-102.
7. Qualification et préparation [Internet], disponible sur <http://toutsurlatransfusion.com/preparation-qualification-biologique-du-don/qualification/interet.php> (consulté le 05/09/19)
8. Lefrère JJ, Andreu G, Barisien C, *et al.* Transfusion sanguine (I). Organisation, bases immunologiques et produits sanguins labiles. EMC-Hématologie. 2012;7(3):1-18.
9. Clément S. Techniques de préparation des produits sanguins labiles et leurs principales indications. *Transfus Clin Biol.* 2011;18(2):250-61.
10. Habibi B, Avenard G, Drouet J, *et al.* Evaluation in vitro et étude de survie in vivo des globules rouges conservés en milieu saline-adenine-glucose-mannitol pendant 35 jours. *Revue Française de Transfusion et Immuno-hématologie.* 1985;28(1):7-18.
11. Saini N, Basu S, Kaur R, *et al.* Assessment of changes in plasma hemoglobin and potassium levels in red cell units during processing and storage. *Transfus Apher Sci.* 2015;52(3):319-25.
12. Sawant R, Jathar S, Rajadhyaksha S, *et al.* Red cell hemolysis during processing and storage. *Asian J Transfus Sci.* 2007;1(2):47-51.
13. Barshtein G, Gural A, Zelig O, *et al.* Preparation of packed red blood cell units in the blood bank: Alteration in red blood cell deformability. *Transfus Apher Sci.* 2020;59(3):102738.
14. Archives RICAI 2017. Laperche S. Risques infectieux transfusionnels [Internet], disponible sur <https://www.ricai.fr/archives-2017> (consulté le 10/03/20).
15. INTS Institut National de Transfusion Sanguine. Sécurité transfusionnelle [Internet], disponible sur <https://www.ints.fr/SangTransfSecurite.aspx#m4> (consulté le 08/09/19).

16. Chabanel A, Masse M, Begue S, *et al.* National French observatory of the quality of blood components for transfusion. *Transfus Clin Biol.* 2008;15(3):85-90.
17. Mitrofan-Oprea L, Palii C, Tissier JP, *et al.* Nouveaux critères d'évaluation de la viabilité des hématies destinées à la transfusion. *Transfus Clin Biol.* 2007;14(4) :393-401.
18. Peyrin C. Mise en place du contrôle qualité des produits finis de l'établissement de transfusion sanguine Isère-Savoie. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier- Grenoble I, 1997, 135 p.
19. Masson S, Quesne V, Rasongles P. La mesure du taux d'hémolyse dans les CGRD, pas si simple ! *Transfus Clin Biol.* 2013;20(3) :337.
20. D'Alessandro A, Kriebardis AG, Rinalducci S, *et al.* An update on red blood cell storage lesions, as gleaned through biochemistry and omics technologies: An omics update on RBC storage. *Transfusion.* 2015;55(1):205-19.
21. Orlov D, Karkouti K. The pathophysiology and consequences of red blood cell storage. *Anaesthesia.* 2015;70(1):29-37.
22. Hess JR. Red cell storage. *J Proteomics.* 2010;73(3):368-73.
23. Hess JR. Red cell changes during storage. *Transfus Apher Sci.* 2010;43(1):51-9.
24. Hematocell.fr Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers. Erythroïèse [Internet], disponible sur <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/20-erythroiose> (consulté le 15/08/19).
25. D'Allard D. Erythroïèse normale et pathologique, internalisation de c-Kit et morphologie du nucléole. Thèse de doctorat en hématologie et Oncologie. Paris: Université Paris 5, 2013, 160 p.
26. Hogman CF, Lof H, Meryman HT. Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate. *Transfusion.* 2006;46(9) :1543-52.
27. Hematocell.fr Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers. Physiologie du globule rouge [Internet], disponible sur <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/globules-rouges-et-leur-pathologie/26-physiologie-du-globule-rouge> (consulté le 15/08/19).
28. Hess JR. Measures of stored red blood cell quality. *Vox Sang.* 2014;107(1):1-9.
29. Bennett-Guerrero E, Veldman TH, Doctor A, *et al.* Evolution of adverse changes in stored RBCs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104 (43):17063-68.
30. Blasi B, D'Alessandro A, Ramundo N, *et al.* Red blood cell storage and cell morphology. *Transfus Med.* 2012;22(2):90-6.
31. Flatt JF, Bawazir WM, Bruce LJ. The involvement of cation leaks in the storage lesion of red blood cells. *Front Physiol.* 2014;5:214.
32. Wallas C. Sodium and potassium changes in blood bank stored human erythrocytes. *Transfusion.* 1979 ;19(2) :210-15.
33. Lacroix J, Tucci M. Impact clinique de la durée de conservation des globules rouges avant transfusion. *Transfus Clin Biol.* 2011;18(2):97-105.
34. Hamasaki N, Yamamoto M. Red blood cell function and blood storage. *Vox Sang.* 2000 ;79 (4) :191-7.
35. Epps DE, Knechtel T-J, Bacznskyj O, *et al.* Tirilazad mesylate protects stored erythrocytes against osmotic fragility. *Chem Phys Lipids.* 1994;74(2):163-74.
36. Sharifi S, Dzik WH, Sadrzadeh SM. Human plasma and tirilazad mesylate protect stored

- human erythrocytes against the oxidative damage of gamma-irradiation. *Transfus Med.* 2000;10(2):125-30.
37. Mangalmurti NS, Chatterjee S, Cheng G, *et al.* Advanced glycation end products on stored red blood cells increase endothelial reactive oxygen species generation through interaction with receptor for advanced glycation end products. *Transfusion.* 2010;50(11):2353-61.
  38. Korgun DK, Bilmen S, Yesilkaya A. Alterations in the erythrocyte antioxidant system of blood stored in blood bags. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2001;109(5-6) :357-63.
  39. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, *et al.* Storage-dependent remodeling of the red blood cell membrane is associated with increased immunoglobulin G binding, lipid raft rearrangement, and caspase activation. *Transfusion.* 2007;47(7):1212-20.
  40. Kriebardis AG, Antonelou MH, Stamoulis KE, *et al.* Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. *J Cell Mol Med.* 2007;11(1):148-55.
  41. Mustafa I, Al Marwani A, Mamdouh Nasr K, *et al.* Time Dependent Assessment of Morphological Changes: Leukodepleted Packed Red Blood Cells Stored in SAGM. *BioMed Res Int.* 2016:1-7.
  42. Laurén E, Tigistu-Sahle F, Valkonen S, *et al.* Phospholipid composition of packed red blood cells and that of extracellular vesicles show a high resemblance and stability during storage. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(1):1-8.
  43. Almizraq R, Tchir JDR, Holovati JL, *et al.* Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality: RMPs and RBC quality measures. *Transfusion.* 2013;53(10):2258-67.
  44. Tinmouth A, Chinyee I. The clinical consequences of the red cell storage lesion. *Transfus Med Rev.* 2001;15(2):91-107.
  45. Roussel C, Dussiot M, Marin M, *et al.* Spherocytic shift of red blood cells during storage provides a quantitative whole cell-based marker of the storage lesion: spherocytic shift of RBCs during. *Transfusion.* 2017;57(4):1007-1018.
  46. Berezina TL, Zaets SB, Morgan C, *et al.* Influence of storage on red blood cell rheological properties. *J Surg Res.* 2002;102(1):6-12.
  47. Relevy H, Koshkaryev A, Manny N, *et al.* Blood banking–induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion.* 2008;48(1) :136-46
  48. Hashemi Tayer A, Amirizadeh N, Ahmadinejad M, *et al.* Procoagulant Activity of Red Blood Cell-Derived Microvesicles during Red Cell Storage. *Transfus Med Hemother.* 2019;46(4):224-30
  49. Willekens FLA, Werre JM, Groenen-Döpp YAM, *et al.* Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? *Br J Haematol.* 2008;141(4):549-56.
  50. Bosman GJCGM, Werre JM, Willekens FLA, *et al.* Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion. *Transfus Med.* 2008;18(6):335-47.
  51. Kozlova E, Chernysh A, Moroz V, *et al.* Nanodefects of membranes cause destruction of packed red blood cells during long-term storage. *Exp Cell Res.* 2015;337(2):192-201.
  52. Tissot J-D, Canellini G, Rubin O, *et al.* Blood microvesicles: From proteomics to physiology. *Translational Proteomics.* 2013;1(1):38-52.

53. García-Roa M, Vicente-Ayuso M del C, Bobes AM, *et al.* Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. *Blood Transfus.* 2017;15(3):222-31.
54. Remy KE, Hall MW, Cholette J, *et al.* Mechanisms of red blood cell transfusion-related immunomodulation: MECHANISMS OF RBC TRIM. *Transfusion.* 2018;5(3):804-15.
55. Kent MW, Kelher MR, West FB, *et al.* The pro-inflammatory potential of microparticles in red blood cell units. *Transfus Med.* 2014;24(3):176-81.
56. Koch CG, Duncan AI, Figueroa P, *et al.* Real Age: Red Blood Cell Aging During Storage. *Ann Thorac Surg.* 2019;107(3):973-80.
57. Prudent M, Tissot J-D, Lion N. In vitro assays and clinical trials in red blood cell aging: Lost in translation. *Transfus Apher Sci.* 2015;52(3):270-276.
58. Beutler E, Kuhl W, West C. The osmotic fragility of erythrocytes after prolonged liquid storage and after reinfusion. *Blood.* 1982;59(6):1141-47.
59. Luten M, Roerdinkholder-Stoelwinder B, Schaap NPM, *et al.* Survival of red blood cells after transfusion: a comparison between red cells concentrates of different storage periods. *Transfusion.* 2008;48(7):1478-85.
60. Heaton A, Keegan T, Holme S. In vivo regeneration of red cell 2,3-diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells. *Br J Haematol.* 1989;71(1):131-36.
61. Bessis M. Erythrocytic series. *Blood Smears Reinterpreted.* Springer International Ed. Berlin, Heidelberg, 1977, pp 51-3
62. Jacobs MH. Osmotic properties of the erythrocyte: I. Introduction. A simple method for studying the rate of hemolysis. *Biol Bull.* 1930;58(1):104-22.
63. Gérard D, Fattet A-J, Brakta C, *et al.* Evaluation of OSMOCELLS, a new semi-automatic device for osmotic fragility assessment. *Int J Lab Hem.* 2017;39(5) :521-27.
64. Chanel L. Recherches sur la résistance des hématies. Thèse de doctorat en médecine. Lyon: Université de Lyon, 1880, 68 p.
65. Wintrobe MM. *Clinical Hematology*, 6ème Edition. Lea & Febiger Ed. Philadelphia, 1967 266 p.
66. Vaughan JM. Red cell characteristics in acholuric jaundice. *J Pathol.* 1937;45(3):561-77.
67. Guest GM. Osmometric behavior of normal and abnormal human erythrocytes. *Blood.* 1948;3(5):541-55.
68. Hunter FT. A photoelectric method for the quantitative determination of erythrocyte fragility. *J Clin Invest.* 1940;19(5):691-4.
69. Parpart AK, Lorenz PB, Parpart ER, *et al.* The osmotic resistance (fragility) of human red cells 1. *J Clin Invest.* 1947;26(4):636-40.
70. Dacie V, Lewis M. *Practical Haematology*, 4ème Edition. Grune and Stratton Inc Ed. New York, 1968, 576 p.
71. Danon D, Frei YF, Rimon A, *et al.* Simple Rapid Osmotic Fragility Test Proposed as a Routine in Blood Banks. *Transfusion.* 1964;4(5):339-42.
72. Danon D. The Fragiligraph and its Application. *Br J Haematol.* 1967;13(4):61-67.
73. Danon D. A rapid micro method for recording red cell osmotic fragility by continuous decrease of salt concentration. *J Clin Pathol.* 1963;16(4):377-82.
74. Danon D, Frei EH, Frei YF, *et al.* An Instrument for Automatically Recording the

- Osmotic Fragility Curve of Red Cells and/or Its Derivative. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1963;10(1):24-8.
85. Didelon J, Mazeron P, Muller S, *et al.* Osmotic fragility of the erythrocyte membrane: characterization by modeling of the transmittance curve as a function of the NaCl concentration. *Biorheology.* 2000;37(5-6):409-16.
  86. Allen TE, Shields CE. Recording Osmotic Fragility of Red Cells on the Spinco Analytrol. *Am J Clin Pathol.* 1966;45(1):112-4.
  87. Harada R, Ito Y, Kimura E. A new method of osmotic fragility test of erythrocytes with coil planet centrifuge. *Jpn J Physiol.* 1969;19(3):306-14.
  88. Ito Y. Origin and Evolution of the Coil Planet Centrifuge: A Personal Reflection of My 40 Years of CCC Research and Development. *Separation & Purification Reviews.* 2005;34(2):131-54.
  89. David S, Lustig H, Nahas GG. Rapid measurements of red blood cell fragility. *Tech Bull Regist Med Technol.* 1969;39(2):25-28.
  90. Ito Y, Carmeci P, Steele R. Continuous flow method for determination of erythrocyte osmotic fragility. *Am J Hematol.* 1977;2(4):403-12.
  91. Yi-Feng Tao, Zeng-Fu Deng, Lin Liao, *et al.* Evaluation of a Flow-Cytometric Osmotic Fragility Test for Hereditary Spherocytosis in Chinese Patients. *Acta Haematol.* 2016;135(2):88-93.
  92. Stoya G, Gruhn B, Vogelsang H, *et al.* Flow Cytometry as a Diagnostic Tool for Hereditary Spherocytosis. *Acta Haematol.* 2006;116(3):186-91.
  93. Warang P, Gupta M, Kedar P, *et al.* Flow cytometric osmotic fragility-An effective screening approach for red cell membranopathies. *Cytom B Clin Cytom.* 2011;80(3):186-90.
  94. Yamamoto A, Saito N, Yamauchi Y, *et al.* Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. *J Lab Autom.* 2014;19(5):483-7.
  95. Ciepiela O, Adamowicz-Salach A, Zgodzińska A, *et al.* Flow Cytometric Osmotic Fragility Test: Increased Assay Sensitivity for Clinical Application in Pediatric Hematology. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(1):189-95.
  96. Won DI, Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. *Cytometry.* 2009;76B(2):135-41.
  97. Tzounakas VL, Anastasiadi AT, Karadimaés DG, *et al.* Temperature-dependent haemolytic propensity of CPDA-1 stored red blood cells vs whole blood - Red cell fragility as donor signature on blood units. *Blood Transfus.* 2017;15(5) :447-55.
  98. Zehnder L, Schulzki T, Goede JS, *et al.* Erythrocyte storage in hypertonic (SAGM) or isotonic (PAGGSM) conservation medium: influence on cell properties. *Vox Sang.* 2008;95(4):280-7.
  99. Tzounakas VL, Georgatzakou HT, Kriebardis AG, *et al.* Donor variation effect on red blood cell storage lesion: a multivariable, yet consistent, story: Donor variation and RBC storability. *Transfusion.* 2016;56(6):1274-86.
  100. Ionescu-Zanetti C, Wang L-P, Di Carlo D, *et al.* Alkaline hemolysis fragility is dependent on cell shape: Results from a morphology tracker. *Cytometry.* 2005;65A(2):116-23.
  101. Jordan A, Chen D, Yi Q-L, *et al.* Assessing the influence of component processing and donor characteristics on quality of red cell concentrates using quality control data. *Vox*

- Sang. 2016;111(1):8-15.
102. Ning S, Heddle NM, Acker JP. Exploring donor and product factors and their impact on red cell post-transfusion outcomes. *Transfus Med Rev.* 2018;32(1):28-35.
  103. Tzounakas VL, Kriebardis AG, Papassideri IS, *et al.* Donor-variation effect on red blood cell storage lesion: A close relationship emerges. *Prot Clin Appl.* 2016;10(8):791-804.
  104. Sparrow RL. Red blood cell components: time to revisit the sources of variability. *Blood Transfus.* 2017;15(2):116-25.
  105. García-Roa M, Vicente-Ayuso M del C, Bobes AM, *et al.* Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. *Blood Transfus.* 2017;15 (3):222-31.
  106. Mushtaq M. Perpetual Smoking Compromise the Osmotic Fragility of RBC. *Biomed Sci.* 2017;3(3):58-62.
  107. Li R, Chen X. Erythrocyte osmotic fragility increases with serum advanced glycated end products in cigarette smokers. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;57(1):85-92.
  108. Kung C-M, Tseng Z-L, Wang H-L. Erythrocyte fragility increases with level of glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009; 43(4):345-51.
  109. Ibanga IA, Usoro C a. O, Nsonwu AC. Glycaemic control in type 2 diabetics and the mean corpuscular fragility. *Niger J Med.* 2005,14(3):304-6.
  110. Priyadarshini KH, Latha PA, Pradnya S, *et al.* Comparative study of erythrocyte fragility in diabetes mellitus and non diabetes mellitus. *Int J Med Res Health Sci.* 2015;4(1):183.
  111. Kanas T, Lanteri MC, Page GP, *et al.* Ethnicity, sex, and age are determinants of red blood cell storage and stress hemolysis: results of the REDS-III RBC-Omics study. *Blood Adv.* 2017;1(15) :1132-41.
  112. Kanas T, Stone M, Page GP, *et al.* Frequent blood donations alter susceptibility of red blood cells to storage- and stress-induced hemolysis. *Transfusion.* 2019;59(1):67-78.
  113. Dumont LJ, AuBuchon JP, Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Evaluation of proposed FDA criteria for the evaluation of radiolabeled red cell recovery trials. *Transfusion.* 2008;48(6):1053-60.
  114. van de Watering L. Red cell storage and prognosis: Red cell storage and prognosis. *Vox Sang.* 2011;100(1):36-45.
  115. Hod EA, Spitalnik SL. Stored red blood cell transfusions: Iron, inflammation, immunity, and infection. *Transfus Clin Biol.* 2012;19(3) :84-9.
  116. Hashemi Tayer A, Amirizadeh N, Ahmadinejad M, *et al.* Procoagulant Activity of Red Blood Cell-Derived Microvesicles during Red Cell Storage. *Transfus Med Hemother.* 2019; 46(4):224-30.
  117. Burnouf T, Chou M-L, Goubran H, *et al.* An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: Are they clinically beneficial or harmful? *Transfus Apher Sci.* 2015;53(2):137-45.
  118. Belizaire RM, Prakash PS, Richter JR, *et al.* Microparticles from stored red blood cells activate neutrophils and cause lung injury after hemorrhage and resuscitation. *J Am Coll Surg.* 2012;214(4):648-55.
  119. Cardo LJ, Wilder D, Salata J. Neutrophil priming, caused by cell membranes and microvesicles in packed red blood cell units, is abrogated by leukocyte depletion at

- collection. *Transfus Apher Sci.* 2008;38(2):117-25.
120. Jy W, Ricci M, Shariatmadar S, *et al.* Microparticles in stored red blood cells as potential mediators of transfusion complications. *Transfusion.* 2011;51(4):886-93.
  121. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007;21(3):157-71.
  122. Wannez A, Devalet B, Chatelain B, *et al.* Extracellular Vesicles in Red Blood Cell Concentrates: An Overview. *Transfus Med Rev.* 2019;33(2):125-30.
  123. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, *et al.* The role of microparticles in inflammation and transfusion: A concise review. *Transfus Apher Sci.* 2015;53(2):159-67.
  124. Safeukui I, Buffet PA, Deplaine G, *et al.* Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. *Blood.* 2012;120(2):424-40.
  125. Safeukui I, Buffet PA, Deplaine G, *et al.* Sensing of red blood cells with decreased membrane deformability by the human spleen. *Blood Adv.* 2018;2(20) :2581-87.
  126. Bazin A. Effets indésirables receveurs : fiches techniques. *Transfus Clin Biol.* 2010 ;17(5-6):366-74.
  127. Bazin A, Trophilme C, Py J-Y, *et al.* Fiches techniques : aide à l'analyse des effets indésirables receveurs. *Transfus Clin Biol.* 2012;19(4-5) :187-94.
  128. Mertes P-M, Boudjedir K. Allergie et transfusion. *Transfus Clin Biol.* 2013;20(2):239-42.
  129. Silliman CC, Ambruso DR, Boshkov LK. Transfusion-related acute lung injury. *Blood.* 2005;105(6):2266-73.
  130. Jaworski K, Maślanka K, Kosior DA. Transfusion-related acute lung injury: a dangerous and underdiagnosed noncardiogenic pulmonary edema. *Cardiol J.* 2013;20(4) :337-44.
  131. Sazio C, Ouattara A. TACO, TRALI, de quoi s'agit-il ? *Le Praticien en Anesthésie Réanimation.* 2013;7(4):169-73.
  132. ANSM (Agence Nationale de sécurité du Médicament et des produits de santé) Fiche technique des Effets Indésirables Receveurs. La Réaction hypotensive transfusionnelle (RHT), mai 2012 [Internet], disponible sur [https://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/e2aa1139c61a798acbbdb39cd8969c2.pdf](https://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/e2aa1139c61a798acbbdb39cd8969c2.pdf) (consulté le 20/12/19).
  133. Marik PE, Sibbald WJ. Effect of stored-blood transfusion on oxygen delivery in patients with sepsis. *JAMA.* 1993;269(23):3024-9.
  134. Offner PJ, Moore EE, Biffl WL *et al.* Increased rate of infection associated with transfusion of old blood after severe injury. *Arch Surg.* 2002;137(6) :711-6.
  135. Koch CG, Li L, Sessler DI, *et al.* Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med.* 2008;358(12):1229-39.
  136. Sanders J, Patel S, Cooper J, *et al.* Red blood cell storage is associated with length of stay and renal complications after cardiac surgery. *Transfusion.* 2011;51(11):2286-94.
  137. Purdy FR, Tweeddale MG, Merrick PM. Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients. *Can J Anaesth.* 1997;44(12):1256-61.
  138. Wang D, Sun J, Solomon SB, *et al.* Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis. *Transfusion.* 2012;52(6) :1184-95.
  139. Lacroix J, Hébert PC, Fergusson D, *et al.* L'étude ABLE : un essai clinique randomisé sur l'effet de la durée d'entreposage des concentrés érythrocytaires transfusés en

- réanimation. *Transfus Clin Biol.* 2015;22(3) :107-11.
140. Eikelboom JW, Cook RJ, Barty R, *et al.* Rationale and Design of the Informing Fresh versus Old Red Cell Management (INFORM) Trial: An International Pragmatic Randomized Trial. *Transfus Med Rev.* 2016;30(1):25-9.
  141. Steiner ME, Assmann SF, Levy JH, *et al.* Addressing the question of the effect of RBC storage on clinical outcomes: The Red Cell Storage Duration Study (RECESS) (Section 7). *Transfus Apher Sci.* 2010;43(1):107-16.
  142. Brunskill SJ, Wilkinson KL, Doree C, *et al.* Transfusion of fresher versus older red blood cells for all conditions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(5):CD010801.
  143. Remy KE, Sun J, Wang D, *et al.* Transfusion of recently donated (fresh) red blood cells (RBCs) does not improve survival in comparison with current practice, while safety of the oldest stored units is yet to be established: a meta-analysis. *Vox Sang.* 2016;111(1):43-54.
  144. Shah A, Brunskill SJ, Desborough MJ, *et al.* Transfusion of red blood cells stored for shorter versus longer duration for all conditions. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018; 2(12):CD010801.
  145. Bardyn M, Tissot J-D, Prudent M. Oxidative stress and antioxidant defenses during blood processing and storage of erythrocyte concentrates. *Transfus Clin Biol.* 2018;25(1):96-100.
  146. Abonnenc M, Tissot J-D, Prudent M. General overview of blood products in vitro quality: Processing and storage lesions. *Transfus Clin Biol.* 2018;25(4):269-75.
  147. Högman CF, Hedlund K, Sahlestrom Y. Red Cell Preservation in Protein-Poor Media: III. Protection Against in vitro Hemolysis. *Vox Sang.* 1981;4 (5-6):274-81.
  148. Chartois-Leaute AG, Rivery E, Laviron B, *et al.* Hémolyse des CGR au cours du processus de préparation : étude comparative de trois DMU de technique de séparation haute et basse (Top/Bottom). *Transfus Clin Biol.* 2013;20(3) :292.
  149. Gkoumassi E, Dijkstra-Tiekstra MJ, Hoentjen D, *et al.* Hemolysis of red blood cells during processing and storage: HEMOLYSIS DURING PROCESSING AND STORAGE. *Transfusion.* 2012;52(3):489-92.
  150. Sowemimo-Coker SO. Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus Med Rev.* 2002;16(1):46-60.
  151. Gu YJ, de Vries AJ, Hagenaaers JAM, *et al.* Leucocyte filtration of salvaged blood during cardiac surgery: effect on red blood cell function in concentrated blood compared with diluted blood. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 2009;36(5):877-82.
  152. Shastry S, Shivhare A, Murugesan M, *et al.* Red cell storage lesion and the effect of buffy-coat reduction on the biochemical parameters. *Transfus Apher Sci.* 2019;58(2):179-82.
  153. Wang Y, Giebink A, Spence DM. Microfluidic evaluation of red cells collected and stored in modified processing solutions used in blood banking. *Integr Biol.* 2014;6(1):65-75.
  154. D'Alessandro A, Culp-Hill R, Reisz JA, *et al.* 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.* 2019;59(1):89-100.
  155. Hansen AL, Kurach JDR, Turner TR, *et al.* The effect of processing method on the *in vitro* characteristics of red blood cell products. *Vox Sang.* 2015;108(4):350-8.
  156. Radwanski K, Garraud O, Cognasse F, *et al.* The effects of red blood cell preparation

method on in vitro markers of red blood cell aging and inflammatory response: Preparation Method and RBC Quality. *Transfusion*. 2013;53(12):3128-38.

# ANNEXES

## I. Indications des CGR [4]

### 1. Anémie aiguë

La décision de transfuser doit reposer sur le seuil transfusionnel mais aussi sur la tolérance clinique de l'anémie. Le seuil transfusionnel est la concentration d'hémoglobine en dessous de laquelle il est recommandé de ne pas descendre. La transfusion dans le cadre des hémoglobinopathies ne sera pas traitée dans ce travail.

#### ➤ Seuils transfusionnels recommandés en anesthésie et en péri-opératoire

- 7 g/dL chez les patients sans antécédents
- 10 g/dL lorsque l'anémie est mal tolérée ou chez les personnes souffrant d'insuffisance coronarienne aiguë ou d'insuffisance cardiaque
- 8-9 g/dL chez les patients avec antécédents cardio-vasculaires

#### ➤ Seuils transfusionnels recommandés en réanimation

- 7 g/dL
- 10 g/dL chez les personnes atteintes d'une insuffisance coronarienne aiguë
- 7 g/dL chez le patient traumatisé (hors traumatisme crânien et hors transfusion massive), si anémie tolérée cliniquement

#### ➤ Seuils transfusionnels recommandés en hématologie (leucémies aiguës de l'adulte, greffes de cellules souches hématopoïétiques, tumeurs solides, hémopathies malignes chroniques myéloïdes ou lymphoïdes de l'adulte)

- 8 g/dL
- 10 g/dL en cas de mauvaise tolérance de l'anémie, ou pathologie cardio-vasculaire associée

### 2. Anémie hémolytique auto-immune

Il est recommandé de transfuser en cas de mauvaise tolérance clinique, il n'existe pas de seuil.

### 3. Seuils transfusionnels en gériatrie (patients de plus de 80 ans)

- 7 g/dL en l'absence d'insuffisance cardiaque ou coronarienne et de mauvaise tolérance clinique
- 8 g/dL chez les patients insuffisants cardiaques ou coronariens
- 10 g/dL en cas de mauvaise tolérance clinique

#### 4. Micro angiopathies thrombotiques, hémolyse mécanique sur valve

- 8 g/dL

#### 5. Néonatalogie

- Seuil transfusionnel chez le nouveau-né d'âge gestationnel  $\geq 32$  semaines d'aménorrhée (SA) ou pesant plus de 1 500 g à la naissance et chez le nourrisson

- 12 g/dL si cardiopathie congénitale cyanogène

- 10 g/dL si non stabilisés en réanimation, sous ECMO ou en postopératoire aigu de chirurgie cardiaque

- 7 g/dL si anémie sans signe clinique, associé à un taux de réticulocytes  $< 100$  G/l

- 8 g/dL si stabilisés en réanimation, ne souffrant pas de cardiopathie ou stabilisés en post-op d'une correction chirurgicale d'une cardiopathie non-cyanogène

- Seuil transfusionnel chez le nouveau-né prématuré d'âge gestationnel  $< 32$  SA et pesant  $< 1 500$  g à la naissance

- Avant le 7<sup>e</sup> jour de vie : 11 g/dL d'hémoglobine si ventilation assistée ou support ventilatoire avec une  $FiO_2 \geq 30\%$ ; 10 g/dL d'hémoglobine si ventilation spontanée ou support ventilatoire avec une  $FiO_2 < 30\%$

- Après le 7<sup>e</sup> jour de vie : 10 g/dL d'hémoglobine si ventilation assistée ou support ventilatoire avec une  $FiO_2 \geq 30\%$ ; 8 g/dL d'hémoglobine si ventilation spontanée avec oxygénodépendance ou support ventilatoire avec une  $FiO_2 < 30\%$ ; 7g/dL d'hémoglobine avec un taux de réticulocytes  $< 100$  G/l chez un enfant asymptotique en ventilation spontanée.

**DEMANDE D'IMPRIMATUR**

Date de soutenance : 27 octobre 2020

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : Emmanuelle STEIN</p> <p><u>Sujet</u> : Concentrés de globules rouges et lésions de stockage : analyse par l'Osmocells® (SD Innovation), évaluation de la fragilité osmotique au cours du stockage</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Mme Béatrice FAIVRE, Professeur          Directeur : M. Julien PERRIN, Maître de conférences          Juges : M. Jean-Yves Jouzeau, Professeur          M. Julien COLLIN, Directeur Biomédical SD          Innovation</p>	<p align="right">Vu, Nancy, le 29 sept 2020</p> <p align="center">Le Président du Jury      Directeur de Thèse</p> <p>Pr. Béatrice FAIVRE M.  M. </p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 2.10.2020</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">   <b>Pr. Raphaël DUVAL</b> </p>	<p align="right">Vu, Nancy, le - 9 OCT. 2020</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">   <b>Pierre MUTZENHARDT</b> </p> <p align="right">N° d'enregistrement : 11463C</p>

N° d'identification :

**TITRE**

**Concentrés de globules rouges et lésions de stockage : analyse par l'Osmocells® (SD Innovation), évaluation de la fragilité osmotique au cours du stockage.**

Thèse soutenue le 27 octobre 2020

Par Emmanuelle STEIN

**RESUME :**

Les concentrés de globules rouges subissent des lésions au cours de leur stockage, ce sont des lésions dites de stockage. Parmi ces lésions, nous pouvons notamment citer une plus grande fragilité osmotique des érythrocytes. Actuellement, l'évaluation de ces lésions ne repose que sur la mesure du taux d'hémolyse en fin de stockage. Pour être conforme à la délivrance, un CGR doit avoir une hémolyse inférieure à 0,8%.

Il serait intéressant de mesurer un autre paramètre facilement mesurable en routine et reflétant les lésions de stockage. L'évaluation de la fragilité osmotique par l'Osmocells®, automate semi-automatique commercialisé par SD Innovation pourrait correspondre à ces critères.

Le but de ce travail a été d'évaluer au CHRU de Nancy l'impact de la production de CGR ainsi que de la conservation sur la fragilité osmotique des globules rouges afin de discuter sa place éventuelle dans l'évaluation de la qualité des CGR. L'étude a été réalisée sur 9 CGR provenant de 9 donneurs sains de l'EFS. Pour évaluer l'impact de la production des CGR, nous avons comparé la fragilité osmotique des tubes EDTA prélevés le jour même du don avec la fragilité osmotique des CGR sortant du plateau de production. Pour évaluer l'impact du stockage des CGR, nous avons cette fois comparé la fragilité osmotique des CGR à J1, J20 et J40 du stockage.

Les résultats ont montré une fragilité osmotique augmentée à l'issue du processus de préparation mais également au cours du stockage. L'Osmocells® nous a permis de conclure à un impact probable du processus de préparation des CGR mais aussi du stockage sur la fragilité osmotique des CGR, confirmant son intérêt potentiel pour le suivi des culots érythrocytaires.

**MOTS CLES :** Lésions de stockage - Fragilité osmotique - Osmocells® - Concentrés de globules rouges

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Julien PERRIN, MCU-PH	Service d'hématologie biologique CHRU Nancy  Faculté de Pharmacie Université de Lorraine	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème <input checked="" type="checkbox"/>

<u>Thèmes</u>	1 – Sciences fondamentales 3 – Médicament ⑤ - Biologie	2 – Hygiène/Environnement 4 – Alimentation – Nutrition 6 – Pratique professionnelle
---------------	--	---