



**HAL**  
open science

# Suivi du comportement osmotique des plaquettes sanguines : Développement et évaluation d'un test automatique de mesure de la réponse des plaquettes à des variations de pression osmotique

Thierry Gigout

► **To cite this version:**

Thierry Gigout. Suivi du comportement osmotique des plaquettes sanguines : Développement et évaluation d'un test automatique de mesure de la réponse des plaquettes à des variations de pression osmotique. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1998. Français. NNT : 1998NAN11015 . tel-01748368

**HAL Id: tel-01748368**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748368>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-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>



Diplôme de **THESE**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE NANCY I**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Thierry GIGOUT**

le 24 septembre 1998

## **SUIVI DU COMPORTEMENT OSMOTIQUE DES PLAQUETTES SANGUINES**

Développement et évaluation d'un test automatique de mesure  
de la réponse des plaquettes à des variations de pression  
osmotique.

Directeur de thèse :

Docteur F. PAULUS

### **JURY**

Président	<b>J.-F. STOLTZ</b>	Professeur
Rapporteur	<b>G. POTRON</b>	Professeur
Rapporteur	<b>G. SCHULTZ</b>	Professeur
Examineur	<b>C. VIGNERON</b>	Professeur
Directeur de thèse	<b>F. PAULUS</b>	Docteur
Membre invité	<b>F. SCHOONEMAN</b>	Docteur
Membre invité	<b>J. DIDELON</b>	Ingénieur Inserm

## *Avant Propos*



### *Doctorat effectué au sein du :*

Laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie  
LEMTA - UMR CNRS 7563  
et Equipe FR CNRS-UHP-INPL-CHU  
Faculté de Médecine, Brabois, Bâtiment E, BP 184  
54505 VANDOEUVRE -les- NANCY  
  
Directeur : Professeur J-F STOLTZ

### *Financement :*

Réalisation du transfert industriel : "FRAGILIMETRE"  
Contrat de Licence n° 96 014 entre U.H.P. - REGULEST  
( dossier technique et conception de deux appareils)

### *en collaboration avec :*

Société REGULEST  
Z.I. Ste Agathe  
57192 FLORANGE  
  
Directeur : J-C BAUQUIS



## **A Monsieur le Professeur Jean-François STOLTZ**

Il m'a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire. Il m'a suggéré le sujet de ce mémoire et m'a donné les moyens de réaliser ce travail. Je tiens à le remercier pour l'intérêt et la confiance qu'il a accordé à mes travaux. Qu'il veuille bien trouver ici, le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

## **A Monsieur Jacques DIDELON**

C'est un exercice quasi impossible que de résumer en quelques mots ma profonde reconnaissance envers cette personne que je considère à la fois comme mon Maître dans les disciplines technologiques, mon confident, ma critique, ... . Le niveau de mes compétences n'a cessé de s'enrichir à ses côtés. Le partage des informations, des expériences, des bons et moins bons moments a consolidé un esprit de travail, d'équipe et a favorisé l'aboutissement de mes travaux. Sa disponibilité, sa rigueur, son enthousiasme, nos discussions, ses attitudes, son humour, ont composé les ingrédients de cette réussite.

Il m'a donné le goût de la recherche et a permis l'édification de ce travail. Pour ses qualités humaines et scientifiques, je tiens à lui exprimer ma plus vive gratitude, ma profonde reconnaissance et je l'assure de ma respectueuse admiration.

## **A Madame Francine PAULUS**

Elle a accepté de remplir le rôle difficile de Directeur de thèse. Je l'en remercie vivement et lui exprime toute ma gratitude.

## **A Messieurs les Professeurs Gérard POTRON et Gérard SCHULTZ**

Ils ont accepté de juger ce travail, et d'en être les rapporteurs. Je leur exprime mes remerciements et toute ma reconnaissance.

## **A Monsieur le Professeur Claude VIGNERON**

Il a accepté de juger ce travail. Il m'a fait l'honneur de participer au jury. Ses travaux sur ce sujet ont servi de base à mes recherches. Je lui exprime ma profonde gratitude.

## **A Monsieur le Docteur François SCHOONEMAN**

Je tiens à lui adresser mes sincères remerciements pour avoir fourni les échantillons sanguins nécessaires à cette étude, pour l'intérêt qu'il a montré au test proposé et pour avoir accepté de juger mes travaux. Que Madame le Docteur CLAISE soit associée à ces vifs remerciements.

## **A Monsieur Jean-Claude BAUQUIS, directeur de la société REGULEST**

Dans le cadre du transfert industriel " Fragilimètre", il m'a assuré un financement. Je l'en remercie.

### **A Mesdames Monique GENTILS et Ghislaine CAUCHOIS**

Je tiens à leur exprimer mes plus chaleureux remerciements pour leur aide précieuse dans la réalisation de nombreuses mesures, et pour leur compétence, leur gentillesse, leur écoute, ... .

### **A Madame Véronique REGNAULT**

Elle a consacré de son temps pour de précieuses corrections, qu'elle trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

### **A Monsieur Dominique DUMAS**

Pour son amitié, ses conseils, son sens critique, ses corrections, pour m'avoir proposé de partager son bureau, qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance

### **A Monsieur Walter BLONDEL**

Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour les conseils qu'il m'a apporté dans le domaine de l'électronique et pour son amitié.

### **A Madame le Docteur Véronique CANNARD**

Pour sa contribution dans les protocoles d'études des concentrés plaquettaires, pour ses conseils en biologie, pour son aide à la rédaction d'un article, pour sa sympathie, je l'assure de ma profonde gratitude.

### **A Monsieur le Docteur Emmanuel DEMAISTRE**

Son concours m'a permis d'enrichir les interprétations des mesures effectuées sur le Fragilimètre. Il m'a fourni des échantillons de sang pathologique et a encouragé la réalisation d'expériences (tests) à l'établissement de transfusion de Lionnois. Qu'il trouve ici, l'assurance de ma reconnaissance.

### **A Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE**

Je lui exprime mes sincères remerciements pour l'intérêt marqué à mes travaux et pour m'avoir encouragé à présenter mes premiers résultats au CTS de Brabois.

### **A Monsieur le Docteur HUMBERT**

Qui a suivi avec beaucoup d'intérêt l'élaboration des Fragilimètres et qui m'a ouvert les portes de ses services à Brabois et à Lionnois. Qu'il veuille bien trouver ici, le témoignage de ma sincère reconnaissance.

### **A Monsieur Michel MAUGRAS**

Je le remercie pour le prêt de son matériel informatique qui m'a permis de numériser quelques documents d'illustration

Je suis infiniment reconnaissant aux **équipes de cytologie**. Particulièrement aux **techniciennes de Lionnois** pour leur aide à l'utilisation du compteur cellulaire. A **Samantha et Sylvie** pour leur contribution fastidieuse dans la quantification des glycoprotéines. J'adresse également mes vifs remerciements aux **infirmières du service de cytophérèse** pour les préparations de concentrés plaquettaires et pour leur sympathie.

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au cours de ce doctorat pour l'ambiance agréable et saine, pour leur humour, leur sympathie, ...

**Aurore, Brigitte, Claude, Frédérique, Joëlle, Lalie, Nathalie, Pierre, Rachel, Robert, Séverine, Sun, Sylvaine, Vénus, Xang, ... .**

**A tous les donateurs bénévoles** qui ont accepté de céder une partie de leur don en sang à la recherche.

**A Anne-Sophie**

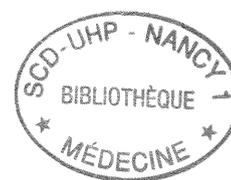
**A Nicole et Jean-Paul**

**A mes amis**

en témoignage de toute mon affection

# *Sommaire*

# SOMMAIRE



## INTRODUCTION GENERALE .....15

### PREMIERE PARTIE :

## LA PLAQUETTE OU LE THROMBOCYTE .....19

<b>1. PHYSIOLOGIE</b> .....	<b>20</b>
1.1. STRUCTURE DE LA PLAQUETTE .....	22
1.1.1. Zone périphérique de la plaquette.....	22
1.1.2. Zone cytoplasmique (Hyalomère).....	24
1.1.3. Zone des organelles cytoplasmiques (Granulomère).....	25
1.2. COMPOSITION CHIMIQUE .....	26
1.3. FONCTIONS .....	26
1.4. PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.....	27
1.5. ETAT DE LA QUESTION .....	29
<b>2. CONSERVATION (4).....</b>	<b>31</b>
2.1. PRÉPARATION DES CONCENTRÉS PLAQUETTAIRES .....	31
2.1.1. Concentrés Standards de plaquettes : C.S.P.....	31
2.1.2. Concentrés de plaquettes d'aphérèse : C.P.A. ....	32
2.1.3. Techniques et appareillage pour obtenir des C.P.A.....	33
2.2. CONSERVATION DES CONCENTRÉS PLAQUETTAIRES .....	34
2.2.1. Méthodologie.....	34
2.2.2. Facteurs influençant la qualité plaquettaire et leurs conséquences .....	35
2.3. CONTRÔLE DE QUALITÉ.....	37
2.4. PROBLÉMATIQUE .....	37
<b>3. METHODES D'EXPLORATION EN HEMOSTASE.....</b>	<b>39</b>
3.1. LE TEMPS DE SAIGNEMENT ( <i>IN VIVO</i> ).....	39
3.2. NUMÉRATION PLAQUETTAIRE ( <i>IN VITRO</i> ).....	39
3.3. FONCTIONNALITÉ .....	39
3.4. MESURE DE LA DURÉE DE VIE.....	41
<b>4. METHODES D'EVALUATION <i>IN VITRO</i> DES CONCENTRES PLAQUETTAIRES .....</b>	<b>42</b>
4.1. L'INDICE DE TOURNOIEMENT OU SWIRLING .....	42
4.2. LE TEST DU SCORE MORPHOLOGIQUE .....	43
4.3. LE TEST D'ALLONGEMENT PAR CHANGEMENT DE FORME (" <i>EXTENT OF SHAPE CHANGE</i> ") (ESC).....	43
4.4. LE CONTENU EN ATP TOTAL .....	43
4.5. LA MESURE DU VOLUME PLAQUETTAIRE MOYEN .....	43
4.6. LE DOSAGE DE SUBSTANCES SÉCRÉTÉES .....	44
4.7. TEST D'ÉVALUATION PAR LA LECTURE D'UNE TRANSMISSION LUMINEUSE À TRAVERS LES POCHE DE CONSERVATION. ....	44
4.8. LES TESTS DE LA RÉPONSE OSMOTIQUE DES PLAQUETTES.....	45
<b>5. ETAT DES LIEUX.....</b>	<b>46</b>

## DEUXIEME PARTIE :

### LA RESISTANCE OSMOTIQUE DES PLAQUETTES .....47

1. INTRODUCTION.....	48
2. HISTORIQUE.....	49
2.1. RECHERCHE D'UN TEST.....	49
2.2. BILAN DE CES RECHERCHES.....	55
3. "REPOSE AU CHOC HYPOTONIQUE" R.C.H.....	58
3.1. PRINCIPE DE LA TECHNIQUE.....	58
3.2. UTILISATION DU TEST "RÉPONSE AU CHOC OSMOTIQUE".....	60
4. PROBLEMATIQUE.....	63

## TROISIEME PARTIE :

### ADAPTATION DU FRAGILIMETRE A L'ETUDE DE LA RESISTANCE OSMOTIQUE DES PLAQUETTES .....64

1. INTRODUCTION.....	65
2. GENERALITES.....	66
2.1. LA PRESSION OSMOTIQUE.....	66
2.1.1. La membrane biologique.....	67
2.1.2. La membrane semi-perméable.....	70
2.1.3. Température, volume des compartiments.....	71
2.1.4. Application au Fragilimètre.....	71
2.1.5. Etat des lieux.....	73
2.2. DIFFUSION LUMINEUSE.....	73
2.2.1. Introduction.....	74
2.2.2. Théorie de la diffusion.....	74
2.2.3. Diffusion sur des plaquettes.....	78
2.2.4. Discussion.....	81
3. FRAGILIMETRE DISPOSITIF DE MESURE PAR DIALYSE LENTE.....	84
3.1. L'INFORMATION "FORCE IONIQUE".....	84
3.2. L'INFORMATION "TRANSMISSION LUMINEUSE".....	87
3.3. RAPPELS : APPLICATION AUX HÉMATIES.....	87
3.4. ADAPTATION DU LOGICIEL INFORMATIQUE.....	88
3.5. ETAT DE LA QUESTION.....	90
4. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES PLASMAS RICHES EN PLAQUETTES.....	92
4.1. PRP STANDARDS OBTENUS À PARTIR DE SANG TOTAL :.....	92
4.2. PRP OBTENUS À PARTIR DE CONCENTRÉS PLAQUETTAIRES PRÉPARÉS PAR APHÉRÈSE :.....	93
5. ANALYSE DE LA REPOSE DU SYSTEME.....	94
5.1. EVOLUTION DE LA FORCE IONIQUE AU COURS DU TEMPS.....	95
5.2. STABILITÉ DANS LE TEMPS DE L'INTENSITÉ D'ÉMISSION DE LA DIODE LASER.....	96
5.3. LE FACTEUR DE SÉDIMENTATION.....	96
5.4. DIFFUSION LUMINEUSE AUTOUR DE LA CUVE.....	98
5.5. DIALYSE CONTRE DES SOLUTIONS DE FORCES IONIQUES DIFFÉRENTES.....	102
5.6. CORRÉLATION AVEC LE VOLUME MOYEN.....	104

5.7. MICROSCOPIE OPTIQUE.....	106
5.8. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE À BALAYAGE.....	106
5.9. ETAT DE LA QUESTION .....	109
<b>6. REALISATION DU TEST "RÉPONSE AU CHOC HYPOTONIQUE".....</b>	<b>113</b>
6.1. ADAPTATION AU FRAGILIMÈTRE.....	113
6.2. ETAT DE LA QUESTION .....	116
<b>7. ETAT ET APPROFONDISSEMENTS DE LA QUESTION.....</b>	<b>117</b>

## **QUATRIEME PARTIE :**

<b>ETUDES MENEES, STATISTIQUES, RESULTATS.....</b>	<b>124</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>125</b>
<b>2. INFLUENCE DE L'ANTICOAGULANT.....</b>	<b>127</b>
<b>3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION PLAQUETTAIRE.....</b>	<b>129</b>
<b>4. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE MESURE.....</b>	<b>131</b>
<b>5. CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES : FIABILITÉ, SENSIBILITÉ, REPRODUCTIBILITÉ .....</b>	<b>132</b>
<b>6. INFLUENCE DE LA PROCEDURE DE TRAITEMENT DES DIALYSES SUR LA RESISTANCE OSMOTIQUE DES PLAQUETTES .....</b>	<b>134</b>
<b>7. EVALUATION DE L'INFLUENCE DE LA TECHNIQUE DE SEPARATION SUR LA VIABILITE DES CONCENTRES PLAQUETTAIRES AU PREMIER JOUR DU PRELEVEMENT.....</b>	<b>136</b>
<b>8. EVALUATION DE LA VIABILITE DE CONCENTRES PLAQUETTAIRES PREPARES DIFFEREMMENT, AU COURS DE LA CONSERVATION SUR 6 JOURS.....</b>	<b>138</b>
8.1. RÉSISTANCE OSMOTIQUE.....	138
8.2. ACTIVATION PLAQUETTAIRE.....	141
8.3. CORRÉLATION ENTRE LA RÉSISTANCE OSMOTIQUE ET L'ACTIVATION.....	143
<b>9. EVALUATION DES CONCENTRES PLAQUETTAIRES PREPARES PAR LE SEPARATEUR AMICUS.....</b>	<b>143</b>
<b>10. BILAN SUR LES RESULTATS.....</b>	<b>146</b>
10.1. LA PREMIÈRE PHASE A PERMIS DE DÉFINIR LES CONDITIONS PRÉANALYTIQUES EN ÉVALUANT L'INFLUENCE DE DEUX ANTICOAGULANTS (CITRATE ET EDTA), DE LA NUMÉRATION CELLULAIRE ET DE LA TEMPÉRATURE. ....	146
10.2. PREMIÈRE APPLICATION DE CE TEST DANS UN PROTOCOLE D'ÉTUDE .....	148
10.3. L'ÉVALUATION DE LA VIABILITÉ DES CONCENTRÉS PLAQUETTAIRES SUIVANT LE MODE DE PRÉPARATION OU LE DÉLAI DE CONSERVATION CONSTITUE LA DEUXIÈME PHASE DE L'ÉTUDE. ....	148

## **CINQUIEME PARTIE :**

<b>SYNTHESE SUR LA MESURE DE LA RESISTANCE OSMOTIQUE DES PLAQUETTES .....</b>	<b>150</b>
---	------------

**SIXIEME PARTIE :**

<b>EVOLUTIONS TECHNOLOGIQUES EN VUE DU TRANSFERT INDUSTRIEL .....</b>	<b>155</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>156</b>
<b>2. CAHIER DES CHARGES .....</b>	<b>158</b>
2.1. SECTION MÉCANIQUE .....	159
2.2. SECTION ÉLECTRONIQUE .....	161
2.3. SECTION INFORMATIQUE .....	161
2.4. EVOLUTION DU CAHIER DES CHARGES AU COURS DE L'ÉLABORATION DE LA VERSION INDUSTRIALISABLE .....	162
<b>3. CONCEPTION ET REALISATION DES PIECES MECANIQUES.....</b>	<b>163</b>
<b>4. CONCEPTION ET REALISATION DES CARTES ELECTRONIQUES .....</b>	<b>164</b>
<b>5. LOGICIEL INFORMATIQUE .....</b>	<b>165</b>
<b>6. BILAN DU TRANSFERT INDUSTRIEL .....</b>	<b>169</b>
<b>CONCLUSION GENERALE, PERSPECTIVES .....</b>	<b>170</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>173</b>



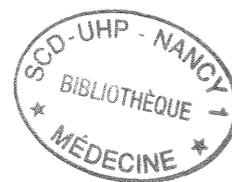
## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organigramme simplifié de la composition du sang .....	20
Figure 2 : la plaquette d'après Boneu B. (1). .....	21
Figure 3 : schéma de la membrane plaquettaire d'après Rock G. (2) .....	23
Figure 4 : schéma général de l'activation et des fonctions plaquettaires, d'après Boneu B. (1). .....	27
Figure 5 : réactions de base de l'activation plaquettaire, d'après Boneu B. (1) .....	28
Figure 6 : schéma montrant une procédure en flux discontinu d'aphérèse (uniponcture) .....	33
Figure 7 : schéma montrant une procédure en flux continu d'aphérèse (biponcture) .....	34
Figure 8 : exemple de fiche de résultats des contrôles de qualité .....	38
Figure 9 : courbes d'agrégation plaquettaire d'après Boneu B. (1). .....	40
Figure 10 : représentation des principales glycoprotéines (Gp) sur les plaquettes au repos et après activation, d'après Nurden P. (21) .....	41
Figure 11 : mesure d'une transmission lumineuse à travers des concentrés plaquettaires, d'après Jaremo P. (31)... ..	44
Figure 12 : schéma représentant la technique préparatoire au choc hypotonique. Par exemple : la dilution utilisée est généralement de 1/2 ou 1/3, soit une force ionique de 0,075 ou 0,1 M.....	58
Figure 13 : courbes obtenues en transmission et en diffusion pour le test de RCH (PRP de $300 \cdot 10^9$ plaquettes/L) d'après travaux de JUNG (76). .....	59
Figure 14 : variation du volume cellulaire produite par des solutions hypertonique, isotonique et hypotonique. ....	69
Figure 15 : représentation schématique des différentes étapes correspondant aux variations de pression osmotique engendrées dans le dispositif de mesure du Fragilimètre. ....	72
Figure 16 : mécanismes de diffusion sur une particule dont la taille est supérieure à $\lambda$ , et dont la valeur de l'indice de réfraction est proche de celle du centre. ....	76
Figure 17 : représentation des trois transmissions caractéristiques de la diffusion pour un faisceau lumineux illuminant une suspension de particules de taille $> \lambda_i$ .....	77
Figure 18 : normalisation de l'extinction de suspension pour des particules non absorbantes dont le volume change, mais pas leur poids sec, d'après Latimer (86) .....	80
Figure 19 : prédiction relative de l'extinction lumineuse en fonction du volume des plaquettes, d'après Latimer (88). $V_o$ et $E_o$ (valeurs normales). .....	80
Figure 20 : spectre d'absorption d'un plasma riche en plaquettes (l'eau distillée a été utilisée comme référence : blanc), obtenu sur un spectrophotomètre Beckmann.....	82
Figure 21 : représentation du dispositif de mesure du Fragilimètre. ....	86
Figure 22 : résultats de la fragilité osmotique des hématies .....	88

Figure 23 : résultats de la résistance osmotique plaquettaire, édités par le <i>Fragilimètre</i> .	90
Figure 24 : coefficient d'atténuation (K) pour des particules (cellules) vis à vis du rayon ( $a_s$ ) de leur sphère équivalente.	91
Figure 25 : courbe représentant la décroissance de la force ionique de l'échantillon en fonction du temps.	95
Figure 26 : représentation de la stabilité en intensité lumineuse de la diode laser.	96
Figure 27 : courbes de transmission lumineuse en fonction du temps pour un même PRP avec une dialyse contre deux milieux de forces ioniques différentes (0 et 0,15 M).	98
Figure 28 : vue du dessus du dispositif de mesure de l'intensité lumineuse diffusée autour de la cuve (sur un axe horizontal).	99
Figure 29 : intégration de la diffusion en anneaux par rapport à la position angulaire du capteur lumineux (exemple pour $\alpha = 12^\circ$ ).	100
Figure 30 : courbes d'intensité de diffusion autour de la cuve en fonction du temps et pour un même PRP.	101
Figure 31 : courbes de transmission lumineuse en valeurs arbitraires (décimales, le seuil initial de transmission est ramené à 0) en fonction du temps, obtenues pour des dialyses contre des milieux de force ionique différente.	102
Figure 32 : courbes de transmission lumineuse exprimées entre 0 et 100 % de la pleine échelle en fonction du temps, obtenues pour des dialyses contre des milieux de force ionique différente.	103
Figure 33 : courbes de transmission lumineuse pour deux phases consécutives (mesure avec dialyse contre un milieu hypertonique (0,25 M), puis dialyse contre un milieu hypotonique (0 M). La mesure classique pour le même PRP débute à 1200 s.	103
Figure 34 : évolution du volume moyen des plaquettes après passage dans le <i>Fragilimètre</i> . (V : volume initial , $V_0$ : volume après fragilisation).	104
Figure 35: représentation de deux gaussiennes représentant la distribution en volume de deux PRP soumis par dialyse lente à deux forces ioniques différentes (0,02 M et 0,1 M).	105
Figure 36 : morphologie des plaquettes observées en microscopie électronique à balayage (grossissement de 9000) pour une force ionique de 0,03M.	107
Figure 37 : morphologie des plaquettes observées en microscopie électronique à balayage (grossissement de 11200) pour une force ionique de 0,03M (cliché choisi pour la présence d'une contamination limitée de plaquettes quasi normales, légèrement activées)	108
Figure 38 : morphologie des plaquettes observées en microscopie électronique à balayage (grossissement de 28000) pour une force ionique de 0.03M.	109
Figure 39 : dispositif de mesure pour analyser le test RCH	113
Figure 40 : Résultats du test RCH édités par le <i>Fragilimètre</i>	115
Figure 41 : synoptique des différents phénomènes influençant l'extinction du faisceau lumineux par une décroissance de la force ionique dans la suspension plaquettaire.	118
Figure 42 : modifications morphologiques des plaquettes soumises à une contrainte hypotonique croissante, d'après FROJMOVIC (103).	121
Figure 43 : représentation des courbes enveloppes (moyenne +/- écart type : $\sigma$ ) du signal de transmission en fonction de la force ionique pour 20 PRP témoins issus de sang total prélevé sur EDTA et 20 PRP témoins issus de sang total prélevé sur citrate.	127

Figure 44 : courbes de transmission lumineuse en fonction du temps obtenues pour des plaquettes d'un même donneur issu de sang total prélevé sur EDTA et citrate (PRP ajustés à la même concentration $430.10^9$ plaquettes/L). Caractérisation des amplitudes et des différents seuils de transmission.....	129
Figure 45 : variations relatives de transmission lumineuse en fonction de la force ionique (pour un même échantillon) avec différentes concentrations cellulaires (plq = plaquettes et $k = 10^9$ ). .....	130
Figure 46 : variations relatives de transmission lumineuse en fonction de la force ionique (pour un même échantillon) pour différentes concentrations cellulaires (plq : plaquettes, $k = 10^9$ ). .....	130
Figure 47 : courbes de transmission lumineuse, exprimées entre 0 et 100 % de la pleine échelle en fonction de la force ionique, pour le même PRP témoin (anticoagulant citrate, $300.10^9$ plaquettes/L) à deux températures de mesures différentes (25 et 37°C). .....	131
Figure 48 : courbes représentatives des valeurs de transmission lumineuse en fonction du temps, caractéristiques de la résistance osmotique plaquettaire d'un même PRP pour 3 températures différentes (10, 22, 37°C).....	132
Figure 49 : valeurs moyennes et $\sigma$ intra donneurs correspondant aux forces ioniques pour le seuil de 50% de transmission (6 mesures consécutives pour 16 donneurs différents).....	133
Figure 50 : courbes enveloppes moyennes de la fragilité plaquettaire correspondant à 96 mesures sur des PRP de donneurs sains. (courbes construites à partir de la courbe moyenne des 96 mesures +/- $\sigma$ ).....	133
Figure 52 : valeurs moyennes, exprimées en unité de la force ionique, des indices caractéristiques de la résistance osmotique des plaquettes avant et après dialyse des patients. (les valeurs notées limite - et limite + correspondent aux valeurs de la courbe enveloppe "référence physiologique"). .....	134
Figure 51 : résultats du protocole sur les patients dialysés en terme de résistance osmotique des plaquettes avant et après traitement .....	135
Figure 53 : courbes moyennes de transmission ramenées entre 0 et 100% en fonction de la force ionique, obtenues pour chaque séparateur (étude à $j=0$ ).....	136
Figure 54 : courbes de transmission lumineuse, exprimée entre 0 et 100% de la pleine échelle, en fonction de la force ionique, protocole d'étude des concentrés plaquettaires au premier jour. ....	137
Figure 55 : courbes moyennes de transmission ramenées entre 0 et 100% en fonction de la force ionique, obtenues pour les concentrés plaquettaires, préparés suivant 4 techniques, à $j=0$ , $j=2$ ou $j=3$ , $j=5$ et $j=6$ . .....	139
Figure 56 : représentation des différentes valeurs de l'indice 50% de transmission (exprimée en force ionique) suivant le concentré préparé et suivant le délai de conservation.....	140
Figure 57 : courbes moyennes de résistance osmotique plaquettaire en fonction de la force ionique, obtenues suivant le temps de conservation de 10 concentrés préparés par le séparateur Amicus. ....	144
Figure 58 : valeurs moyennes, exprimées en force ionique (M), des indices de la résistance osmotique pour 10 concentrés plaquettaires préparés par le séparateur Amicus et conservés 5 jours.....	145
Figure 59 : résultats du test RCH pour le suivi de 10 concentrés plaquettaires conservés et préparés par le séparateur Amicus. ....	145
Figure 60 : courbes témoins de la résistance osmotique des hématies (EDTA) et des plaquettes (EDTA, citrate). .....	147
Figure 61 : représentation des transmissions lumineuses, en valeurs arbitraires en fonction du temps, en relation avec différentes conditions de mesures appliquées à un même PRP (plaquettes issues de sang total prélevé sur l'anticoagulant EDTA).....	152
Figure 62 : courbes comparatives de la lyse plaquettaire .....	154

Figure 63 : schémas mécaniques correspondant aux vues d'ensemble du Fragilimètre prototype (vue de dessus : partie inférieure de la figure, vue de côté : partie supérieure de la figure). .....	158
Figure 64 : exemple de vue d'ensemble pour le montage du Fragilimètre version industrielle. ....	163
Figure 65 : fenêtre graphique affichée sur l'écran de l'ordinateur proposant le menu principal des différentes actions envisageables (commande de l'automatisation, mesures, traitements, sauvegardes, ...).....	165
Figure 66 : fenêtre graphique affichée si l'utilisateur désire intervenir sur les paramètres de mesure. ....	167
Figure 67 : fenêtre graphique proposée pour visualiser les valeurs en continu du paramètre intensité de transmission lumineuse captée.....	167
Figure 68 : algorithme de programmation pour la procédure de commande des moteurs pas à pas. ....	168





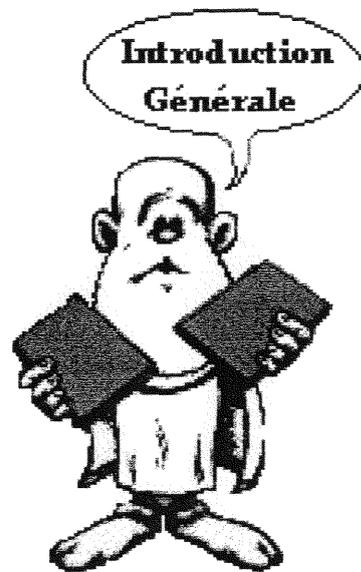
## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : caractéristiques générales de la plaquette .....	22
Tableau II : Principales Glycoprotéines plaquettaires transmembranaires (GP) connues. ....	23
Tableau III : anatomie fonctionnelle de la plaquette.....	30
Tableau IV : caractéristiques des différents séparateurs de cellules utilisés en aphérèse. ....	34
Tableau V : tests utilisés pour évaluer la qualité des concentrés plaquettaires ; d'après MURPHY (23) Recherche effectuée sur Medline pour la période janvier 1980 à septembre 1992 (199 publications).....	45
Tableau VI : termes concernant l'osmolarité des solutés et la tonicité des solutions.....	69
Tableau VII : description des séparateurs utilisés.....	93
Tableau VIII : valeurs fournies par l'automate Counter-Coulter pour un PRP après passage dans le Fragilimètre avec différents temps de mesure.....	105
Tableau IX : Valeurs des indices moyens caractéristiques de la résistance osmotique pour des PRP issu de sang total prélevé sur l'anticoagulant citrate (N=96).....	133
Tableau X : Résistance osmotique à j=0 des concentrés. ....	136
Tableau XI : indices retenus pour l'analyse du suivi de la viabilité de concentrés plaquettaires préparés différemment en fonction des jours de conservation. ....	139
Tableau XII : classement des différents concentrés suivant les jours de conservation en fonction de l'indice de résistance osmotique 50% de Transmission.....	140
Tableau XIII : résultats de la quantification des principales glycoprotéines plaquettaires provenant de différents systèmes d'aphérèse et en fonction des jours de conservation.....	142
Tableau XIII : valeurs des indices caractéristiques de la résistance osmotique plaquettaire obtenues pour 10 concentrés conservés sur 5 jours et préparés par le séparateur Amicus. ....	144

## LISTE DES ABREVIATIONS



PRP	Plasma Riche en Plaquettes
PPP	Plasma Pauvre en Plaquettes
$\beta$ TG	Béta ThromboGlobuline
LDH	Lactate DésHydrogénase
ATP	AdénosineTriPhosphate
F3P	Facteur 3 Plaquettaire
F4P	Facteur 4 Plaquettaire
SCO	Système Canaliculaire Ouvert
STD	Système de Tubulure Dense
GP	GlycoProtéines
DVR	Diminution de Volume Régulé
VPM	Volume Plaquettaire Moyen
NaCl	Chlorure de Sodium
EDTA	Acide éthylènedinitrilotétraacétique
RCH	Réponse au Choc Hypotonique
CPA	Concentré de Plaquettes d'Aphérèse
CSP	Concentré Standard de Plaquettes
CV	Coefficient de Variation
$\sigma$	Ecart Type



# *Introduction Générale*

Le sang coagule dès que, à la suite d'une plaie, il s'épanche hors des vaisseaux. L'équilibre entre excès et insuffisance de fluidité est fondamental. Sans cet équilibre qui est assuré par de nombreux facteurs, au premier plan desquels se trouvent **les plaquettes** sanguines, la vie pour les êtres humains et certaines espèces du règne animal est impossible.

Les plaquettes, bien qu'étant les plus petits éléments figurés du sang, sont le facteur cellulaire indispensable à l'hémostase. L'examen de leurs propriétés biologiques contribue aux diagnostics cliniques des thrombopénies, thrombopathies, ... . De nombreuses techniques ont été proposées pour approcher la fonctionnalité des plaquettes sanguines (adhésion, changement de forme, sécrétion, agrégation, ...). Actuellement la technique, la plus utilisée pour sa simplicité de mise en œuvre, consiste en la mesure photométrique de l'agrégation plaquettaire. Cette méthode mesure, par transmission lumineuse à travers une suspension de PRP, l'agrégation induite par des agents agrégeants (adénosine diphosphate, collagène,...).

L'analyse des propriétés plaquettaires face aux hémorragies ou aux obstructions des vaisseaux ne permet pas à elle seule d'établir les caractéristiques biologiques et rhéologiques de cette cellule. De plus, le traitement de certaines maladies hématologiques malignes (leucémies) nécessite la transfusion de plaquettes fraîches. Ces plaquettes font partie intégrante de la réanimation transfusionnelle et permettent de pallier les inconvénients de la chimiothérapie. Dans ces domaines, où il est nécessaire de s'assurer de l'efficacité d'une transfusion plaquettaire, l'évaluation de la viabilité des cellules est primordial. Pour répondre à ces exigences, il est important de disposer d'un test simple et fiable favorisant un contrôle de qualité des suspensions plaquettaires. Actuellement, les techniques utilisées ne permettent pas de disposer de résultats de référence. Aucun test n'est proposé en routine, parce qu'ils sont encore subjectifs pour certains (évaluation visuelle), non automatisés, techniquement lourds, ..., ou parce qu'ils ne permettent pas d'approcher réellement des paramètres de viabilité des cellules.

Le suivi du comportement des plaquettes en milieu hypotonique est une voie importante pour approcher la viabilité cellulaire. Dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle, de nombreux auteurs ont tenté, en complétant les connaissances sur la résistance osmotique des plaquettes, de proposer des techniques d'étude de leur fragilité. Le problème le plus délicat dans la mise au point d'un test de

fragilité osmotique des plaquettes réside dans le choix de la méthode qui permettra la mise en évidence de la lyse.

L'évolution des technologies, par la mise sur le marché de nouveaux capteurs, de nouvelles sources lumineuses, ..., de matériel informatique toujours plus puissant, permet de disposer de clés pour concevoir des dispositifs de mesure automatique pour répondre à certaines attentes.

La mise au point d'un module spécifique, intégré à un appareil de suivi de l'hémolyse des hématies (automatisation de la technique manuelle de Dacie) : le "Fragilimètre" (licence UHP - Regulest, conçu par J. Didelon) semble être particulièrement adapté à la mesure de la réponse des plaquettes à des variations de pression osmotique.

Pour provoquer le choc hypotonique, le choix s'est porté sur une dialyse lente afin de permettre une diffusion progressive des ions chlorure et sodium. Une membrane semi perméable, utilisée comme enceinte de la solution étudiée, assure cette dialyse. La mesure en continu des variations de transmission lumineuse à travers la suspension est dépendante du changement de volume des cellules, et finalement de la lyse.

L'objet de ce travail est de permettre la découverte du cheminement qui nous a permis de finaliser un nouveau test d'évaluation de la viabilité des plaquettes. Il se présente en six parties :

La première partie débute par une **approche de la physiologie de la plaquette**, en caractérisant ses principaux constituants. **La conservation** des plaquettes est ensuite abordée, sachant que le test automatique que nous proposons se destine en particulier au suivi de la viabilité de ces concentrés plaquettaires avant transfusion. Une **analyse des techniques existantes** d'exploration en hémostase, puis d'évaluation *in vitro* des concentrés plaquettaires clôture cette partie.

La deuxième partie précise, par une approche bibliographique, les résultats des nombreuses recherches menées depuis le début du siècle pour caractériser la **résistance osmotique des plaquettes**. Cette analyse montre qu'actuellement, seul le test dit "**réponse au choc hypotonique**", est pratiqué par certains laboratoires chargés de l'évaluation de la qualité des concentrés plaquettaires.

La troisième partie est consacrée à **l'adaptation du Fragilimètre pour l'étude de la résistance osmotique des plaquettes**. Les différentes propriétés physiques mises en œuvre seront évoquées (pression osmotique, diffusion lumineuse). Des données techniques permettent une description du dispositif de mesure de l'appareil et de son adaptation pour effectuer le test de résistance osmotique des plaquettes par dialyse lente. Une étude préliminaire correspondant à l'examen de la réponse du système autorise une évaluation technique et une première interprétation des mesures réalisées. Afin de préciser les recherches, le test "réponse au choc hypotonique" est proposé sur le Fragilimètre. L'analyse des données obtenues par ces deux techniques, associée aux résultats décrits par différents auteurs, permet de proposer une explication sur la variation des signaux mesurés en fonction des caractéristiques physiologiques propres aux plaquettes.

La quatrième partie propose **les résultats** de différentes séries de mesures. Les premières expériences conduisent à l'évaluation des **conditions préanalytiques**. L'influence de l'anticoagulant, de la concentration plaquettaire et de la température sur les résultats est précisée. Une première application du test dans un protocole d'étude (contrôle de l'incidence des traitements proposés aux patients dialysés) est évoquée. Ensuite, des **évaluations de la viabilité de concentrés plaquettaires** sont effectuées en fonction de la technique de préparation des poches et en fonction des jours de conservation.

La cinquième partie fait **la synthèse** des différentes recherches et des résultats obtenus.

La sixième et dernière partie illustre brièvement **le transfert industriel du Fragilimètre**. Ce chapitre fait le résumé des différentes démarches entreprises afin de disposer d'un appareil prêt à être commercialisé.

Enfin, la conclusion ouvrira sur des perspectives quant à la validation du test de résistance osmotique plaquettaire et aux possibilités d'évolutions offertes.



*La Plaquette*  
*ou*  
*Le Thrombocyte*

## 1. PHYSIOLOGIE (1, 2, 3)

Le sang (fig. 1) est une suspension concentrée de cellules dans une solution aqueuse complexe. Les globules rouges ont pour mission de transporter l'oxygène des poumons aux tissus, les globules blancs assurent une défense contre les agressions microbiennes, **les plaquettes combattent les hémorragies.**

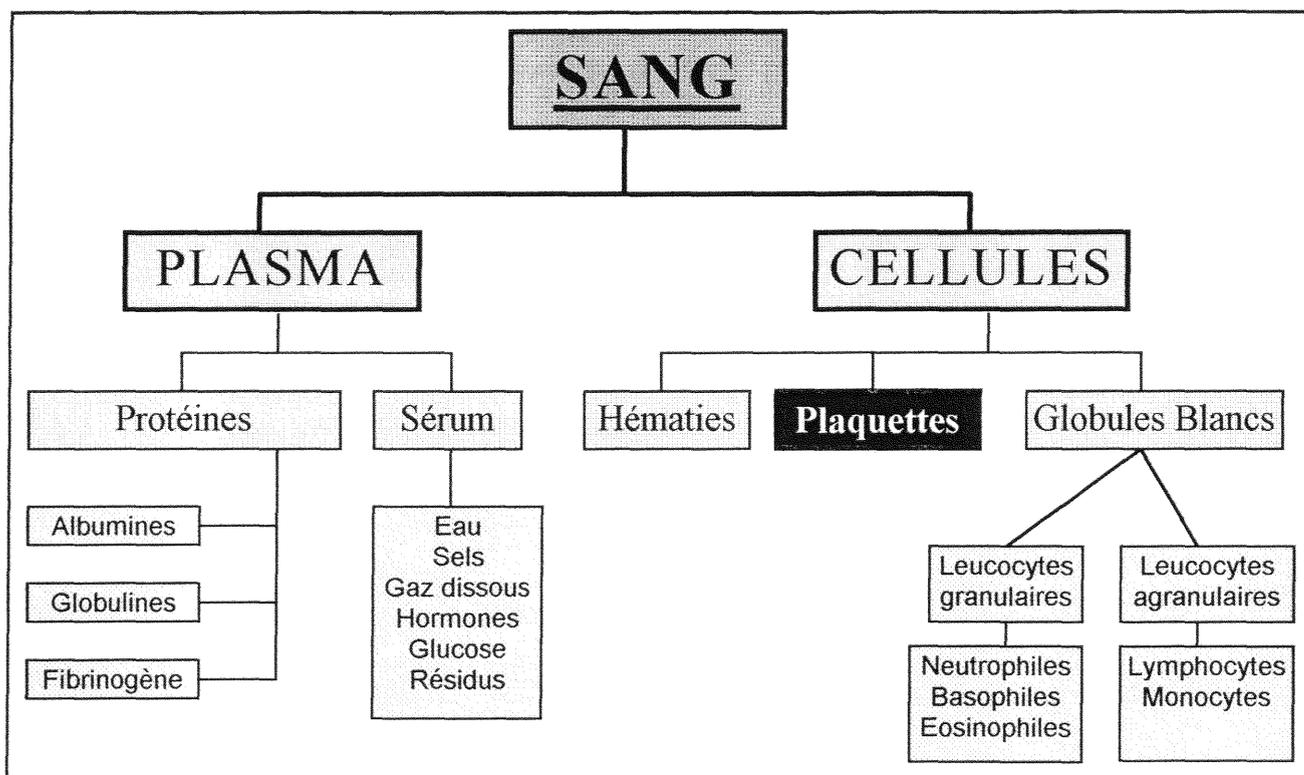


Figure 1 : Organigramme simplifié de la composition du sang.

Ce sont les mégacaryocytes médullaires de la moëlle osseuse qui produisent les plaquettes. La durée de vie moyenne des plaquettes dans le sang étant de 8 à 10 jours, la lignée mégacaryocytaire doit donc, quotidiennement, remplacer 10 à 12 % de la masse plaquettaire de l'organisme (masse plaquettaire = nombre total des plaquettes × volume plaquettaire moyen), ce qui équivaut, chez l'adulte, à une production journalière de quelques 220 milliards de plaquettes.

Les plaquettes (fig 2) sont des cellules anucléées, de forme arrondie ou ovale, d'un diamètre variant de 1 à 4  $\mu\text{m}$  (cf tab I, épaisseur 0.4  $\mu\text{m}$ , volume 5 à 10  $\mu\text{m}^3$ , surface 28  $\mu\text{m}^2$ ). Elles jouent un rôle essentiel dans l'hémostase primaire. Dans le sang circulant, le nombre de plaquettes varie entre  $150.10^9/\text{L}$  et  $400.10^9/\text{L}$ . Les 2/3 de la masse plaquettaire circulent normalement, tandis que 1/3 est séquestré dans la rate. Les plaquettes âgées meurent et sont phagocytées par le système monocyttaire macrophagique du foie, de la moelle osseuse et principalement de la rate.

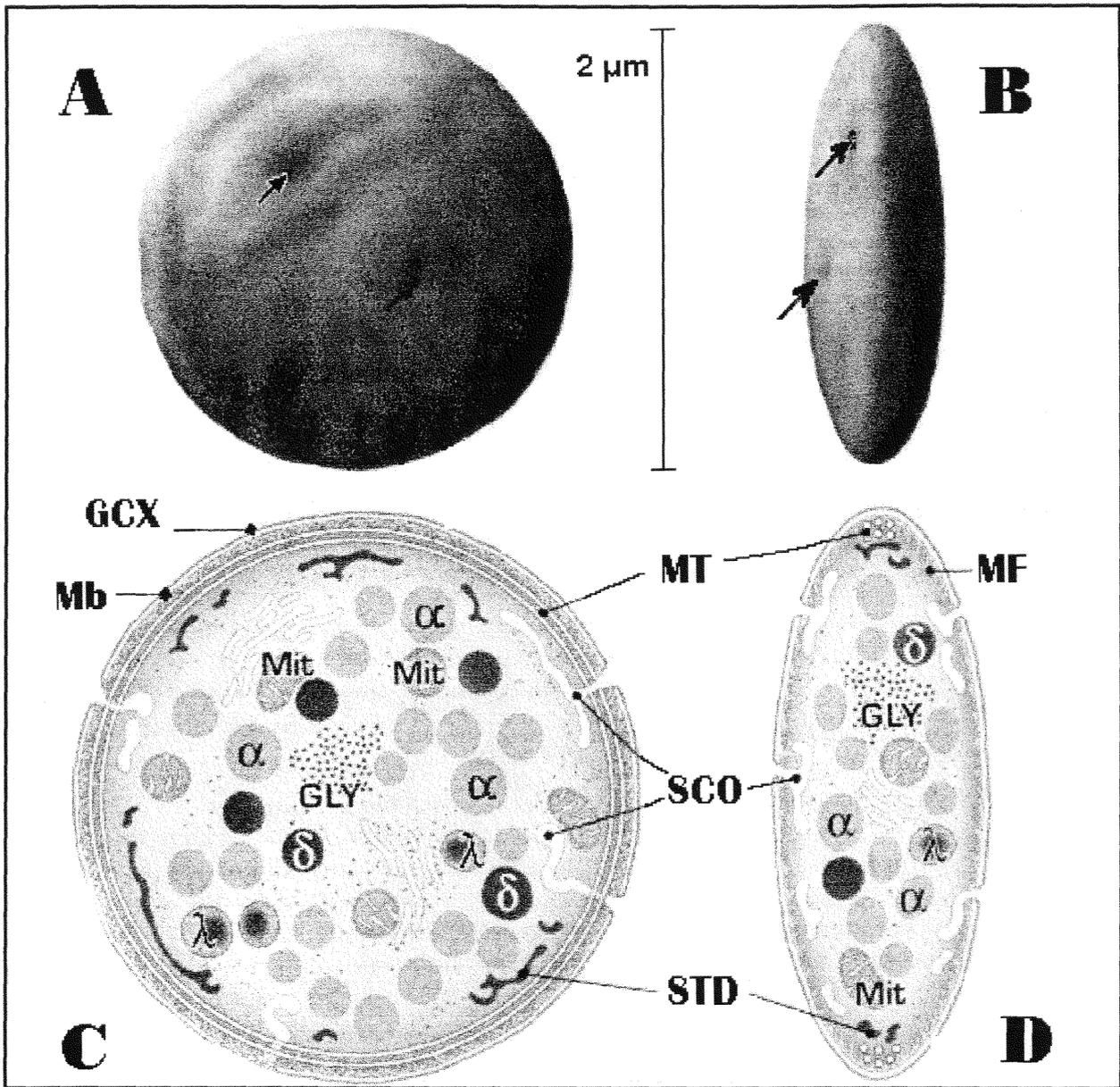


Figure 2 : la plaquette d'après Boneu B. (1).

Les dessins **A** et **B** représentent des plaquettes discoïdes examinées en microscopie électronique à balayage après fixation. La surface des plaquettes est lisse et présente des dépressions (→) qui correspondent à l'émergence vers l'extérieur du système canaliculaire ouvert.

Le schéma **C** résume les principales caractéristiques ultrastructurales observées sur une coupe équatoriale d'une plaquette discoïde.

- La zone périphérique est formée du glycocalix (GCX), de la membrane plasmique trilaminaire (Mb) et d'une zone sous-membranaire riche en microfilaments (MF).
- Le cytoplasme de la plaquette contient des filaments d'actine, les microtubules (MT), circonférentiels et des grains de glycogène (GLY).
- Les organelles contenues dans le cytoplasme sont les mitochondries (Mit), les granules denses ( $\delta$ ), les granules alpha ( $\alpha$ ) et les lysosomes ( $\lambda$ ).
- Les systèmes membranaires de la plaquette sont le système canaliculaire ouvert (SCO) relié à la surface et le système tubulaire dense (STD).

Tableau I : caractéristiques générales de la plaquette

	<b>PLAQUETTE</b>
Forme	disque biconvexe
Diamètre	1 à 4 $\mu\text{m}$
Volume moyen	9 fl
Concentration sanguine moyenne	$250 * 10^9 / \text{L}$
Durée de vie	8 à 10 jours

## **1.1. Structure de la plaquette**

Grâce à l'étude morphologique au microscope électronique, la plaquette peut être divisée en 3 zones principales qui correspondent schématiquement à des spécialisations fonctionnelles et biochimiques. Pour chaque constituant, il est proposé une brève description structurale et fonctionnelle.

### **1.1.1. Zone périphérique de la plaquette**

C'est la zone des systèmes membranaires et des structures qui leur sont associées. La membrane joue un rôle essentiel dans la stimulation des plaquettes par la présence, ou non, dans son environnement de nombreuses substances physiologiques et non physiologiques. La membrane possède des récepteurs pour les molécules du milieu environnant. L'interaction de ces molécules avec les récepteurs de la membrane plaquettaire conduit à l'activation de la plaquette, qui entraîne la transformation de sa surface non adhésive en une surface adhésive ; cela permet l'interaction de la plaquette avec la paroi vasculaire ou avec les autres plaquettes circulantes.

#### **La membrane :**

La membrane des plaquettes est similaire à celle des autres cellules ; elle contient des phospholipides qui sont répartis sous forme d'une double couche, les groupes polaires hydrophiles orientés vers l'environnement extérieur aqueux et les chaînes d'acides gras fluides vers l'intérieur (fig 3). Entre ces phospholipides fluides, des molécules de cholestérol stabilisent et rigidifient la membrane.

La surface externe de la membrane est recouverte d'une couche caractéristique d'environ 10 à 50 nm appelée espace périplaquettaire. Elle est constituée de mucopolysaccharides acides et d'acide sialique.

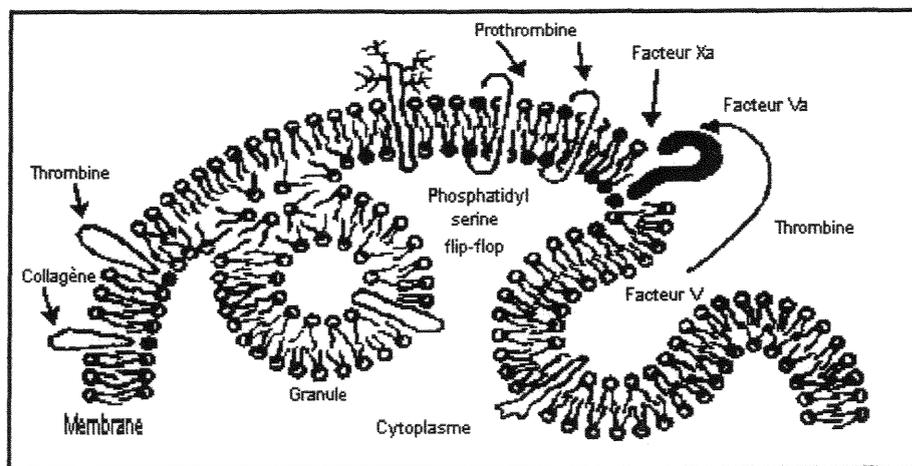


Figure 3 : schéma de la membrane plaquettaire d'après Rock G. (2)

Dans la membrane sont insérés des glycolipides et des glycoprotéines (tab II). Une des propriétés importantes des glycoprotéines, comme des phospholipides de la membrane, est leur répartition asymétrique. Les glycoprotéines transmembranaires mettent en communication l'extérieur de la cellule avec le système contractile sous-membranaire. Parmi les glycoprotéines plaquettaires, des groupes ou des complexes de glycoprotéines de surface ont été identifiés. Ils sont responsables de réactions plaquettaires spécifiques et jouent un rôle de récepteurs.

Tableau II : Principales Glycoprotéines plaquettaires transmembranaires (GP) connues.

<b>GP Ib</b> ou CD42b	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Récepteur facteur von Willebrand</li> <li>◆ Support de l'adhésion au sous-endothélium</li> </ul>	25000 molécules / plaquette
<b>GP IIb / IIIa</b> ou CD41/CD61	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Récepteur fibrinogène et facteur von Willebrand</li> <li>◆ Impliquée dans les phénomènes d'agrégation plaquettaire</li> </ul>	50000 molécules / plaquette
<b>GP Ia / IIa</b> ou CD49b/CD29	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Récepteur collagène</li> <li>◆ Deuxième récepteur de l'adhésivité plaquettaire</li> </ul>	< 2000 molécules / plaquette
<b>GP IV</b> ou CD63	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Récepteur thrombospondine</li> <li>◆ Impliquée dans la fixation au collagène et dans la consolidation du thrombus</li> </ul>	10000 à 20000 molécules / plaquette
<b>GMP140</b> ou sélectine-P	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ marqueur de l'activation plaquettaire</li> </ul>	2000 à 10000 sites / plaquette

Les composants de la membrane plasmique fournissent les récepteurs pour les stimuli qui vont activer la plaquette. Le signal qui va déclencher les modifications de la surface cellulaire et qui est transmis au travers de la membrane va initier les réactions qui aboutissent au changement de forme des plaquettes, à la formation de pseudopodes, à la contraction interne, à la sécrétion et à l'agrégation.

### **1.1.2. Zone cytoplasmique (Hyalomère)**

#### **Le cytoplasme**

Il contient des protéines fibrillaires dont le degré de polymérisation varie selon l'état d'activation de la plaquette.

#### **Les canalicules**

Il existe deux systèmes de canalicules à l'intérieur de la plaquette :

- le système des canalicules ouverts. Il est constitué d'invaginations tortueuses de la membrane plaquettaire reliées à la surface. C'est par son intermédiaire que les substances d'origine plasmatique ont accès à l'intérieur de la plaquette par endocytose, et que le contenu des granules plaquettaires est sécrété. Il représente une source importante de membrane utilisable pour la formation de filopodes et lors de l'étalement des plaquettes.
- le système tubulaire dense. Il forme des complexes membranaires avec le système canaliculaire ouvert. Il ressemble au réticulum sarcoplasmique du muscle. Le système tubulaire dense est le lieu de séquestration du calcium qui active le système contractile des plaquettes, ainsi que les enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique.

#### **Les microtubules**

Les microtubules sont répartis en faisceau de 3 à 10 éléments, à la périphérie de la cellule. Leur diamètre est de 20 nm. Ils jouent un rôle dans le maintien de la forme discoïdale des plaquettes, dans la formation des pseudopodes et dans la contraction de la plaquette. **En effet, une modification de la forme de la cellule correspond à la dépolymérisation (réaction réversible) et à la désorganisation des microtubules.**

## Les microfilaments

Les microfilaments sont nombreux et répartis surtout à la périphérie de la cellule, près de l'anneau des microtubules. Ils participent à la formation des pseudopodes et interviennent dans la contraction des plaquettes.

### **1.1.3. Zone des organelles cytoplasmiques (Granulomère)**

Les **mitochondries** sont petites, rondes ou ovales, au nombre de 1 à 5 par plaquette. Elles participent à la production d'énergie cellulaire. L'**appareil de Golgi** (ou ce qui reste de celui-ci) est présent dans plusieurs plaquettes. Sa fonction n'est pas définie.

Quelques **ribosomes** sont normalement présents. Ils sont en plus grand nombre dans les plaquettes jeunes et de grande taille ; celles-là sont le siège d'une synthèse protéique intense.

#### **Les inclusions**

Le glycogène intrathrombocytaire est sous forme de granulations irrégulières (15 à 30 nm), parfois groupées en amas. Le glycogène est la principale source énergétique de la cellule. La présence occasionnelle d'inclusions lipidiques est liée à la dégénérescence de la plaquette.

#### **Les granules**

Les granules constituent la majorité du chromomère ; ils sont nombreux, entre 3 et 25 par plaquette.

On distingue trois types :

- les granules denses (250-300 nm de diamètre, haute densité en microscopie électronique) qui contiennent de très fortes concentrations de calcium, d'ADP, d'ATP, de sérotonine, de pyrophosphate et de l'adrénaline. Après activation, elles sécrètent leur contenu dans le milieu extérieur.
- les granules alpha (300-500 nm de diamètre, densité moyenne en microscopie électronique) qui contiennent de nombreuses protéines dont la fonction n'est pas toujours parfaitement établie. Elles sécrètent leur contenu dans le milieu extérieur, après activation des plaquettes.
- les lysosomes contiennent des enzymes dont la sécrétion ne survient qu'en cas de stimulation maximum de la plaquette. Cette sécrétion pourrait jouer un rôle dans la dégradation de la matrice conjonctive de la paroi vasculaire.

## **Les vacuoles**

Ce sont principalement des vacuoles contractiles placées au centre de la cellule.

## **1.2. Composition Chimique**

L'étude biochimique a révélé que les plaquettes ne sont pas des particules inertes. Au contraire, elles sont le siège d'une activité métabolique intense. Près de 80 enzymes différentes ont été identifiées, qui sont les signes d'une activité synthétique importante et d'une utilisation d'énergie.

En poids sec, les plaquettes renferment 60% de protéines, 15% de lipides et 8,5% de glucides. La teneur en eau est élevée, soit environ 75% du poids total. Les minéraux présents sont le sodium ( $\text{Na}^+$ , 39 mEq/l), le potassium ( $\text{K}^+$ , 118 mEq/l), le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), le zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) et le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ).

## **1.3. Fonctions**

Les plaquettes jouent un rôle important dans l'hémostase, principalement dans l'hémostase primaire.

Les principales fonctions des plaquettes sont les suivantes :

- elles contribuent au maintien de l'intégrité des endothéliums vasculaires. Elles empêchent les microhémorragies en utilisant le tissu lésé comme substrat de l'adhésion thrombocytaire.
- elles interviennent de façon directe dans la formation du clou thrombocytaire grâce à leurs propriétés d'adhésion, de sécrétion et d'agrégation.
- elles libèrent certains facteurs au cours de la phase de sécrétion, nécessaires à la formation de la fibrine.
- elles transportent diverses substances comme la sérotonine, les catécholamines et l'histamine ; ce sont des amines vasoconstrictrices qui interviennent dans la physiologie des vaisseaux.
- elles jouent un rôle important dans la rétraction du caillot.

## 1.4. Propriétés Biologiques

Les plaquettes individuelles circulent sous forme discoïde ou ovale dans un état de non activation au travers du système cardiovasculaire bordé d'une monocouche de cellules endothéliales intactes et non thrombogènes. En réponse à certaines conditions physiologiques ou pathologiques qui entraînent une lésion de la paroi vasculaire, des modifications du débit sanguin ou l'apparition dans la circulation sanguine d'une ou plusieurs substances biologiquement actives, les plaquettes vont moduler leur degré d'activation ou d'inhibition.

L'**activation des plaquettes** (fig 4) en réponse à différents stimuli ou agonistes (ligands endogènes ou exogènes) se fait par étapes progressives selon une réaction plaquettaire de base univoque.

Selon l'intensité du stimulus, qui réagit avec un récepteur membranaire spécifique, les plaquettes discoïdes vont changer de forme, sécréter le contenu de leurs granules ( $\alpha$ , denses, lysosomes) et former des eicosanoïdes, puis agréger (fig 5). Ces étapes différentes, changement de forme, adhésion, sécrétion, agrégation, sont des processus actifs de nature contractile qui nécessitent une dépense énergétique, fournie par le glucose et le compartiment cytoplasmique métabolique d'ATP et la mobilisation d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ).

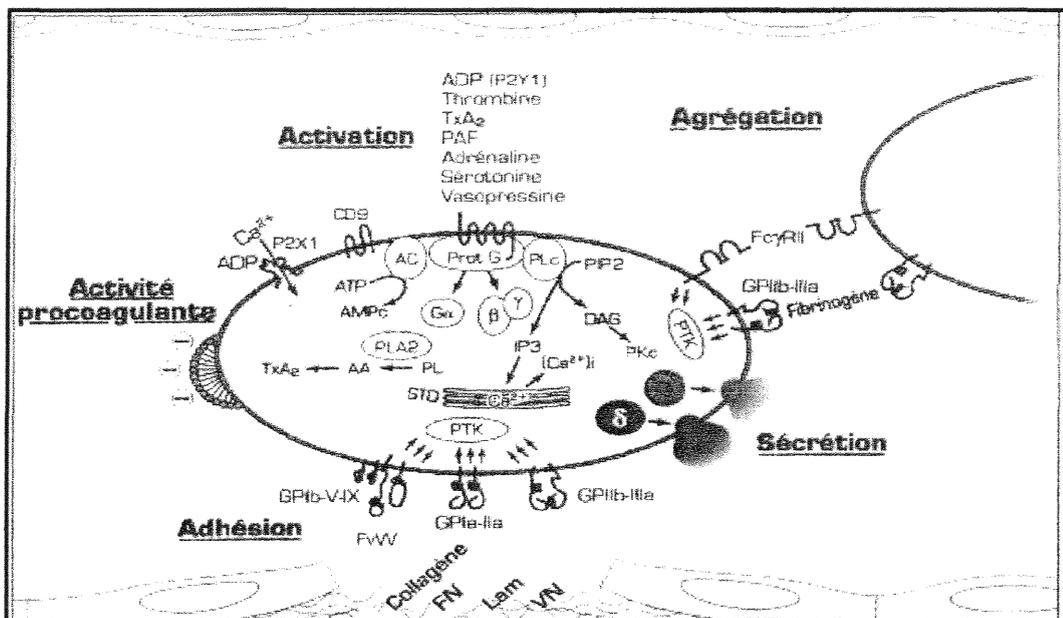


Figure 4 : schéma général de l'activation et des fonctions plaquettaires, d'après Boneu B. (1).

### l'adhésion :

L'adhésion est la propriété qu'ont les plaquettes de se fixer sur des surfaces étrangères : les structures sous-endothéliales ou les surfaces inertes (verre). Le traumatisme d'un vaisseau, par exemple, entraîne l'adhésion des plaquettes à cet endroit. Il s'agit du stade initial de l'hémostase.

### la sécrétion :

Au cours de l'hémostase primaire, la plaquette se comporte comme une véritable cellule sécrétoire. Elle rejette dans le milieu extérieur les constituants des granules denses : d'abord l'ADP et l'ATP du compartiment de réserve, la sérotonine, les catécholamines, le  $K^+$ , le  $Ca^{2+}$  et le Facteur 4 Plaquettaire (F4P) puis les constituants des granules alpha : Facteur 3 Plaquettaire (F3P), enzymes hydrolytiques et fibrinogène. Ces substances empruntent le système des canalicules ouverts et sont sécrétées.

### l'agrégation :

L'adhésion des plaquettes au collagène est suivie de la phase de sécrétion puis de l'agrégation des plaquettes entre elles. Dans ce processus, les plaquettes se fixent les unes aux autres. On distingue deux vagues d'agrégation. La première vague est déclenchée par l'ADP extrinsèque provenant de cellules endothéliales lésées ou de globules rouges hémolysés. Elle est réversible et coïncide avec la phase de sécrétion des constituants plaquettaire. L'ADP intra plaquettaire du compartiment de réserve est libéré, il déclenche la deuxième vague d'agrégation. Celle-là est irréversible et mène à la lyse de la cellule.

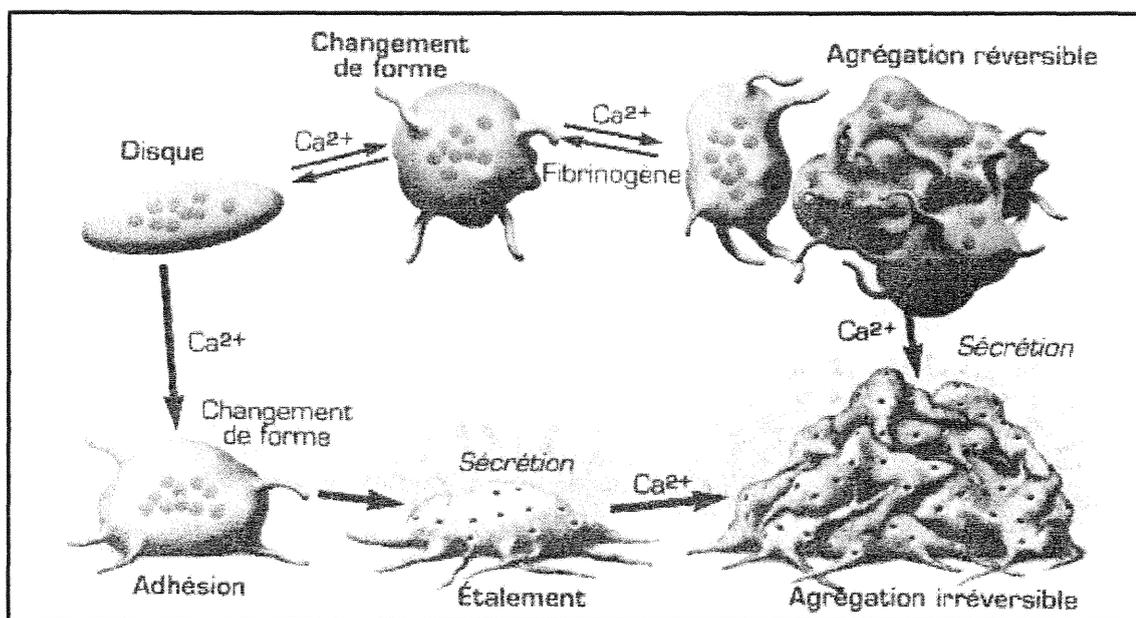


Figure 5 : réactions de base de l'activation plaquettaire, d'après Boneu B. (1)

## **1.5. Etat de la question**

Cette rapide présentation de la physiologie générale de la plaquette et de ses fonctions, permet de considérer les événements qui interviendront dans l'étude de la résistance osmotique (voir tableau III page suivante).

La membrane des plaquettes jouera l'un des principaux rôles : au niveau des changements de forme, du gonflement osmotique, des échanges entre le milieu intra et extra-cellulaire et des glycoprotéines qu'elle renferme.

La structure des microfilaments et des microtubules interviendra dans la régulation ou le maintien de la forme discoïdale.

Les systèmes canaliculaires ouverts apporteront un surplus membranaire pour permettre le changement de forme et le gonflement sans rupture, et permettront les premiers échanges (sécrétion).

Le système tubulaire dense quant à lui apporte une réserve membranaire et, par la séquestration du calcium, intervient également dans la régulation du volume.

La plaquette en subissant une contrainte hypotonique pendant les mesures de résistance osmotique, rend chaque élément sensible à cette "agression".

La mesure de la résistance osmotique des plaquettes, quelle que soit la méthode utilisée (choc ou dialyse), est délicate compte tenu de leur activation aisée (changement de forme, agrégation, sécrétion). Elle doit être réalisée sous 3, voire 2 heures après le prélèvement.

Tableau III : anatomie fonctionnelle de la plaquette

STRUCTURE	FONCTIONS
<p><b>Membrane plasmique</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● double couche de phospholipides</li> <li>● Glycoprotéines (GP) insérées dans les deux couches de phospholipides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* structure de base ;</li> <li>* précurseur des prostaglandines ;</li> <li>* précurseur d'autres métabolismes lipidiques ;</li> <li>* sources des surfaces procoagulantes.</li> <li>* charpente membranaire ;</li> <li>* récepteurs de surface : <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ pour les agonistes (ex: thrombine, collagène), et pour les antagonistes (ex: prostacycline) ;</li> <li>◆ pour les cofacteurs : <ul style="list-style-type: none"> <li>◇ GP Ib pour le facteur von Willebrand ;</li> <li>◇ complexe GP IIb-IIIa (plaquette activée) pour le fibrinogène, le facteur von Willberand et la fibronectine.</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Charpente sous-membranaire</b></p> <p>cytosquelette de microtubules en cercles rattachés à la face interne de la membrane plasmique</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* maintien de la forme discoïde</li> </ul>
<p><b>Systèmes membranaires intracytoplasmiques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● système canaliculaire ouvert à la surface la surface externe de la membrane plasmique est perforée de minuscules ouvertures qui correspondent aux embouchures de canalicules. Ceux-là sont formés par de nombreuses invaginations de la membrane plasmique dans la profondeur de la cellule.</li> <li>● système tubulaire dense analogue au réticulum endoplasmique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* canaux de sécrétion dans le plasma du contenu des granulations de stockage ;</li> <li>* formation de pseudopodes (plaquettes activées) par évagination des membranes intra-cytoplasmiques ;</li> <li>* exposition à la surface des plaquettes actives de récepteurs membranaires qui sont enfouis au repos.</li> <li>* synthèse des prostaglandines ;</li> <li>* stockage et flux intracellulaire (cytosol) du calcium ionisé (transmission de l'activation).</li> </ul>
<p><b>Organites et granulations intra-cytoplasmiques</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● communs à la plupart des cellules <ul style="list-style-type: none"> <li>◇ mitochondries, particules de glycogène</li> </ul> </li> <li>● granulations spécifiques des plaquettes <ul style="list-style-type: none"> <li>◇ granulations denses</li> <li>◇ granulations alpha</li> <li>◇ lysosomes</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* maintien de la bio-énergétique et de l'intégrité cellulaire.</li> <li>* stockage et sécrétion de substances agrégantes (ADP, sérotonine, calcium) ;</li> <li>* stockage et sécrétion de facteurs de coagulation (facteur V, fibrinogène), de cytoadhésines (facteur von Willebrand, fibronectine, thrombospondine) et de facteurs de croissance cellulaire.</li> <li>* hydrolases, protéines cationiques.</li> </ul>

## **2. CONSERVATION (4)**

En laboratoire, la conservation des plaquettes est difficile et ne dépasse pas quelques heures. Elles sont détruites par la congélation ordinaire. La congélation par l'azote liquide a cependant permis la conservation à long terme des plaquettes autologues et de plaquettes compatibles.

Le traitement de certaines pathologies (thrombocytopénies, thrombopathies, néoplasies avec atteinte des plaquettes) nécessite la transfusion de plaquettes fraîches. L'efficacité d'une transfusion plaquettaire est étroitement liée à la qualité de la préparation, mais aussi au respect des conditions optimales (environnement : poches, agitation, température, ...). Au cours des dernières années, les méthodes d'obtention des produits plaquettaires se sont diversifiées (concentration de PRP, isolement de plaquettes à partir des couches leuco-plaquettaires mélangées ou non, plaquettes d'aphérèse), les procédés de séparation se sont développés (filtration, irradiation gamma ou UV, milieu synthétique de conservation, inactivation). Après le prélèvement, les plaquettes sont séparées des autres éléments du sang puis conservées à 22°C, dans un appareil qui les agite doucement et constamment. Elles doivent être utilisées le plus rapidement possible (avant 72 heures). Après 24 heures, leur efficacité diminue de façon nette. Après 96 heures, on a évalué que seulement 30 % des plaquettes sont viables et que leur durée de vie moyenne est alors de 4 jours.

Les besoins transfusionnels se sont intensifiés (réanimation transfusionnelle, chimiothérapie, ...), et la recherche d'un contrôle de qualité fiable et référencé s'impose.

### **2.1. Préparation des concentrés plaquettaires**

Il existe deux méthodes pour préparer des concentrés plaquettaires.

#### **2.1.1. Concentrés Standards de plaquettes : C.S.P.**

Le concentré plaquettaire est un composant obtenu à partir de sang frais et renfermant la plupart des plaquettes d'origine sous une forme efficace au plan thérapeutique.

Suivant la technique de préparation, la teneur en plaquettes par équivalent d'une seule unité est comprise entre 45 et 85.10<sup>9</sup>, le milieu de suspension étant de 50 à 60 mL (la teneur en leucocytes se situe entre 0,05 et 1.10<sup>9</sup> et en érythrocytes entre 0,2 et 1.10<sup>9</sup> par équivalent d'une seule unité). La quantité de

plaquettes contenue dans une "unité standard" de plaquettes reconstituées équivaut à la quantité obtenue à partir de quatre à six unités de sang total.

La technique de préparation repose sur une double centrifugation d'une unité de sang frais de façon à ce qu'un nombre optimal de plaquettes reste dans le plasma et que le nombre de leucocytes et d'érythrocytes soit ramené à un niveau déterminé (la première centrifugation permet de préparer un PRP ; la seconde, puissante, permet de concentrer le PRP).

Remarque : des concentrés de plaquettes déleucocytés peuvent être préparés par filtration.

### **2.1.2. Concentrés de plaquettes d'aphérèse : C.P.A.**

Les CPA sont définis, depuis l'Arrêté du 15/11/1993 paru au J.O. du 30/11/1993, comme une suspension de plaquettes obtenue aseptiquement par une aphérèse plaquettaire à l'aide d'un séparateur de cellules automatique à partir du sang veineux d'un donneur jugé apte médicalement.

Suivant la méthode de préparation et l'appareil utilisé, le nombre de plaquettes se situe entre 200 et 800.10<sup>9</sup>/L. De même, la contamination leucocytaire ou érythrocytaire du produit peut varier selon le procédé et le type d'appareils utilisés. Cette technique permet de prélever des plaquettes chez des donneurs sélectionnés, de réduire le risque d'allo-immunisation HLA et de traiter efficacement des patients déjà allo-immunisés. Le nombre de donneurs auxquels il est fait appel étant moindre, le risque de contamination virale se trouve lui aussi réduit.

L'unité standard doit être équivalente à 5 unités de plaquettes reconstituées provenant chacun d'un donneur unique. La préparation des CPA doit se faire en accord avec les bonnes pratiques, arrêté du 7/02/1994 publié au J.O. du 23/02/1994 (respect de nombreux aspects légaux).

#### **Intérêt des CPA**

Par l'obtention d'une grande quantité de plaquettes à partir d'un seul donneur :

- baisse des risques immunologiques ;
- baisse des risques infectieux ;
- meilleure qualité du produit ;
- contrôle systématique du produit.

### **2.1.3. Techniques et appareillage pour obtenir des C.P.A.**

Il existe différents séparateurs de cellules. Seuls les appareils utilisés dans le service d'aphérèse de l'Etablissement de Transfusion Sanguine de Nancy-Brabois et qui ont fait l'objet de protocoles d'études, seront décrits brièvement.

Chaque appareil est composé de l'association d'un séparateur et d'un disponible.

#### **Le séparateur :**

il existe 2 grandes familles d'appareils selon le mode de centrifugation :

- soit une centrifugation à débit séquentiel (le sang est fractionné à partir de plusieurs unités prélevées successivement chez le même donneur). La phase de prélèvement sanguin et celle de transfusion, retour vers le donneur, ne sont donc pas concomitantes. Une seule veine est nécessaire, uniponcture (fig 6), mais la procédure est longue.

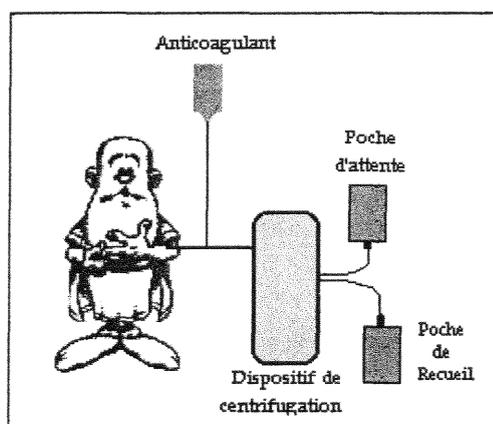


Figure 6 : schéma montrant une procédure en flux discontinu d'aphérèse (uniponcture)

- soit une centrifugation à débit continu où le sang est fractionné immédiatement (prélèvement et restitution sont quasi-simultanés). Les plaquettes sont préparées dans une chambre de séparation et directement transférées dans la chambre de collecte. Deux veines distinctes (chaque pli des 2 coudes) sont nécessaires, biponcture (fig 7).

#### **Le disponible :**

Il est composé d'un réseau de tubulures et d'un système centrifugeur, le tout formant un circuit extra-corporel qui traite plusieurs litres de sang (usage unique).

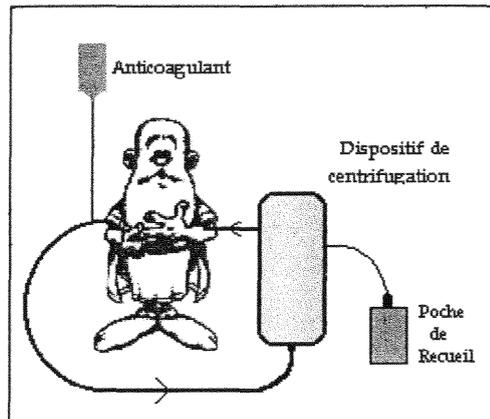


Figure 7 : schéma montrant une procédure en flux continu d'aphérèse (biponcture)

Le tableau IV permet de résumer les caractéristiques des 5 séparateurs de cellules.

Tableau IV : caractéristiques des différents séparateurs de cellules utilisés en aphérèse.

Séparateurs	Uni- poncture	Bi- poncture	type de déleucocytation	Volume de sang traité
Spectra [Cobe Inc]	-	+	Système LRS (cône - Elutriation)	4 - 5,5 L
MCS [Haemonetics Inc]	+	-	Filtre PALL (immédiate en fin de procédure)	4 L
AS 104 [Fresenius Inc]	-	+	Programme spécial (modification de l'interface)	6 L
Amicus [Baxter Inc]	-	+	Elutriation à l'intérieur de la ceinture	4 - 5,5 l.
Excel [Didéco Inc]	-	+	Non Déleucocyté	5 - 5,5 L

remarque : pour un donneur sain une poche contenant usuellement 400 à 600 ml de concentré plaquettaire est obtenue (concentration comprise entre 1 et  $1.5 \cdot 10^{12}$ /L de plaquettes).

## **2.2. Conservation des concentrés plaquettaires**

### **2.2.1. Méthodologie**

Depuis l'Arrêté du 15/11/1993 publié au J.O. du 30/11/1993, la conservation des concentrés plaquettaires doit être effectuée de façon rigoureuse. Il est préconisé de maintenir les poches sous une agitation lente et continue (garantissant un apport d'oxygène) à une température contrôlée à  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Les plaquettes conservent leur viabilité jusqu'à 7 jours dans des conditions optimales. Il n'est toutefois pas recommandé actuellement de les conserver plus de 5 jours.

En fait, les plaquettes doivent être conservées dans des conditions qui assurent de façon optimale leur survie et leur activité hémostatique.

### **2.2.2. Facteurs influençant la qualité plaquettaire et leurs conséquences**

S'il est vrai que les conditions de prélèvement, la nature de l'anticoagulant, les procédés de préparation par aphérèse, les procédés de purification (5), de même que les étapes de centrifugation (6), de filtration (7,8) peuvent créer des traumatismes favorables à une activation plaquettaire irréversible, il est clair que la majorité des lésions induites lors de toute manipulation de plaquettes (9) est amplifiée et observée durant la phase de conservation pendant 5 voire 7 jours et plus (10). Il convient donc de connaître et de contrôler les paramètres qui ont une influence directe ou indirecte sur la plaquette et son environnement.

- Une diffusion correcte du gaz carbonique et de l'oxygène au travers de la paroi du contenant plastique, à haute perméabilité gazeuse permettra de préserver la concentration en bicarbonate et de retarder, au delà de 5 jours, une chute dramatique du pH en dessous de 6,3. Cet échange gazeux sera favorisé par un ratio-volume contenu sur volume contenant inférieur à 1/6. Lorsque la chute du pH est responsable de la formation d'agrégats visibles, une simple inspection visuelle éliminera ce produit non conforme. Une chute de pH, à contrôler généralement en fin de période de conservation, peut également être responsable de modifications irréversibles de forme de la plaquette. Il est admis que la viabilité plaquettaire après transfusion est corrélée avec le nombre ou pourcentage de plaquettes discoïdes dans la suspension. Au jour  $j=0$ , un concentré plaquettaire renferme, environ, entre 60 et 80 % de formes discoïdes. Après 5 jours, seulement 30 à 50 % de formes discoïdes sont observées. La structure et le matériau de la poche influencent la "bonne" conservation des concentrés (11).
- De même que le volume de la suspension, une concentration plaquettaire élevée ( $> 1,3 \cdot 10^{12}$  plaq/L) peut être responsable d'une baisse du pH. Paradoxalement, une faible concentration peut induire une augmentation anormale du pH ( $>7,4$ ), corrélée avec une faible viabilité plaquettaire (12). Cette surveillance est particulièrement nécessaire pour les différentes catégories de concentrés de plaquettes d'aphérèse, au regard de la grande variabilité des concentrations obtenues.
- La nature du milieu de suspension ou de resuspension joue un rôle primordial sur le maintien de la morphologie et des fonctions plaquettaires. De nombreuses publications (13)

justifient le mélange plasma-milieu synthétique (entre 60 et 80 %) pour prolonger la durée de conservation des concentrés plaquettaires et diminuer les intolérances dues aux protéines plasmatiques ou de dégradation (histamine, cytokines, bradikinine, kallicréines). Quatre types de composants sont généralement présents dans les milieux synthétiques : l'électrolyte (sodium, potassium, magnésium, chlorure), le substrat énergétique (acétate, dextrose), le tampon (gluconate, phosphate, bicarbonate) et l'anticoagulant (citrate). Dans un souci de maintien des qualités fonctionnelles, il est préférable d'envisager l'utilisation de ce type de milieu dès la préparation initiale du concentré plaquettaire, plutôt que seulement pendant la période de conservation. Cela permet d'éviter d'une part un traumatisme néfaste aux plaquettes, consécutif à une centrifugation puissante, et d'autre part une inéluctable perte plaquettaire de l'ordre de 15 à 20 %. En d'autres termes, la déplasmatisation des concentrés plaquettaires doit demeurer l'exception, au regard de leur qualité.

- Le contrôle de température entre 20 et 24°C pendant la conservation, ou lors d'un transport éventuel, contribue au maintien de la viabilité plaquettaire. Quelques études récentes (14,15) concluent à une diminution sensible de la viabilité, corrélée à une perte de 20 % de formes discoïdes, pour des valeurs critiques telles que 16°C pendant 16 heures, 12°C pendant 10 heures ou encore 4°C pendant 6 heures. Les valeurs limites de température et de durée d'exposition critiques sont déterminées à 18°C pendant 24 heures. L'agitation est également un facteur influent (16).
- Une contamination leucocytaire importante, due à de mauvaises conditions de préparation, induit directement ou indirectement des effets cliniques (réaction fébrile immédiate, allo-immunisation) et biologiques délétères (compétition dans la consommation d'oxygène, relargages d'enzymes, chute du pH, formations d'agrégats) (17,18). Une étude (19) a montré la génération de cytokines par des cellules monocytaires activées, impliquant le surnageant plasmatique dans les réactions pyrogéniques post-transfusionnelles. Toutes ces études concluent à l'intérêt évident d'une déleucocytation par filtration précoce. Celle-là se généralise et mène à une amélioration sensible des concentrés de plaquettes conservées (10). Cet isolement des cellules doit être régulièrement contrôlé par des méthodes de comptages précises et fiables, afin de garantir au prescripteur la conformité fixée par les caractéristiques (moins de  $10^6$  leucocytes contaminants par produit plaquettaire déleucocyté).

### **2.3. Contrôle de qualité**

Par définition, le contrôle doit faire la preuve de la conformité ou de la non conformité du produit plaquettaire aux spécifications ou exigences de qualité préalablement définies (exemple de résultats : figure 8).

Les caractéristiques de cette conformité semblent déterminées par la capacité de recirculation *in vivo*, pendant une durée de vie attendue, même si la quantification de ce paramètre se heurte parfois à des situations cliniques très variables (13). L'objectif actuel du contrôle de qualité des plaquettes et de leur environnement est de ne retenir que les tests dont les résultats ont un intérêt clinique évident et dont l'interprétation conduit sans ambiguïté, à l'acceptation ou au rejet du produit avant son utilisation.

Un autre objectif, plus pragmatique, est la vérification de la conformité du produit plaquettaire à un niveau minimum de qualité requis, défini dans les caractéristiques (normes, standards). Celui-là se limite à une inspection visuelle avant cession, à une numération leucocytaire et plaquettaire, à l'appréciation de l'effet de tournoiement et à une mesure épisodique du pH.

### **2.4. Problématique**

Les poches de concentrés plaquettaires sont essentielles à des patients atteints de maladies hématologiques malignes (90% de leucémies). Ces plaquettes font partie intégrante de la réanimation transfusionnelle et permettent de pallier les inconvénients de la chimiothérapie.

Les concentrés sont conservés durant une période maximale légale de 5 jours. Les donneurs bénévoles motivés en cytophérèse sont donc des maillons indispensables.

Il est important de disposer de produits fiables. Pour s'en assurer, toutes les manipulations de préparation (prélèvement, séparateur, poches, anticoagulant,...), de conservation (température, agitation), de contamination éventuelle, ..., doivent être menées rigoureusement en accord avec les divers décrets. Ainsi pour l'assurance d'une efficacité optimale, un contrôle de qualité par l'intermédiaire de tests de référence doit être pratiqué.

Face à la pratique transfusionnelle actuelle, les contrôles proposés, nécessaires, sont-ils suffisants ?

*Qualité*

**FICHE DE RESULTATS  
DES CONTROLES DE QUALITE  
(PRODUITS OU REACTIFS)**

Objet de la demande : Contrôle qualité d'un CPA à swirling négatif  
 Service ou personne concerné : Distribution PSL  
 Produit contrôlé : CPA en provenance de Nancy Date du contrôle : 21/05/97  
 Dispositif - Lot : Poche simple Haemonetics - lot n° QQ97069  
 Poche prélevée le 20/05/97  
 N° d'identification : 9735688  
 Paramètre(s) contrôlé(s) :  
 et Résultats

	9735688
Swirling	négatif
pH	6.01 (non conforme)
Concentration en plaquettes x 10 <sup>11</sup>	3,9
Test de stérilité BacTAlert	Négatif

	Valeur attendue à J1	Valeur trouvée
ESC	20 à 30 %	0 %
HSR	50 à 90 %	0 %
% de discoïdes	> 60 %	0 % : plaquettes ballonnées et plaquettes avec beaucoup de pseudopodes

**COMMENTAIRES**

Test de swirling négatif avec un pH de 6.01 non conforme. Ce produit a certainement été transporté dans de mauvaises conditions. De plus, la richesse en plaquettes est faible : environ 3.9 x 10<sup>11</sup> (taux plus faible que celui indiqué sur la poche).

**CONCLUSION**

CONFORME(S)

NON CONFORME(S)   
 Produit non distribuable, à détruire.

Date : 10/06/97

Visa contrôle : Cl. Maurice Masse  
 Responsable Assurance Qualité  
 ETS de Franche Comté

Figure 8 : exemple de fiche de résultats des contrôles de qualité

### **METHODES D'EXPLORATION EN HEMOSTASE**

De nombreuses publications se sont attachées à décrire une multitude de tests permettant d'apprécier la fonctionnalité, la morphologie, l'activité métabolique, la lyse, l'état d'activation des plaquettes. Parmi les nombreuses techniques qui existent, il ne sera cité brièvement que celles qui présentent un intérêt clinique.

#### **3.1. Le temps de saignement (*in vivo*)**

Le temps de saignement est le seul test pratiqué *in vivo*. Il explore l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, ainsi que le facteur von Willebrand. Il est de 4 à 8 minutes chez l'homme adulte (utilisation de petits appareils à usage unique et stérile, technique dérivée de la méthode d'Ivy).

#### **3.2. Numération plaquettaire (*in vitro*)**

La numération des plaquettes est réalisée à l'aide d'automates ou par comptage manuel sous microscope optique (plus très utilisé). Le nombre normal de plaquettes est compris entre 150 et 400  $\times 10^9/L$ . L'aspect des plaquettes sur le frottis sanguin doit aussi être étudié, permettant d'apprécier la taille des plaquettes et la présence d'éventuels agrégats plaquettaires.

Les appareils automatiques (type Coultronics: Counter-Coulter, Technicon H2, ...) permettent d'obtenir, en plus de la numération, des informations sur le volume moyen des plaquettes.

#### **3.3. Fonctionnalité**

##### **Adhésion plaquettaire (*in vitro*)**

L'adhésion plaquettaire est difficile à explorer en routine. Une des techniques consiste en la numération des éléments figurés avant et après passage du sang total ou du plasma dans des tubes capillaires.

##### **Agrégation plaquettaire (*in vitro*)**

Depuis les travaux de BORN en 1963 (20), l'agrégation des plaquettes est étudiée par la mesure en continu dans un agrégamètre des variations de transmission d'un faisceau lumineux au travers d'un PRP après addition d'un agent agrégant (fig 9). L'agrégation des plaquettes d'un PRP s'associe à un éclaircissement du milieu, donc à une augmentation de l'intensité lumineuse captée.

Du fait de l'opacité du milieu réactionnel, ce principe ne peut être utilisé dans le cas de l'analyse en sang total. Les agrégamètres en sang total reposent sur les variations d'impédance du milieu après agrégation des plaquettes.

Remarque : il est possible également de déterminer un pourcentage d'agrégation par comptage (hémocytomètre ou compteur électronique)

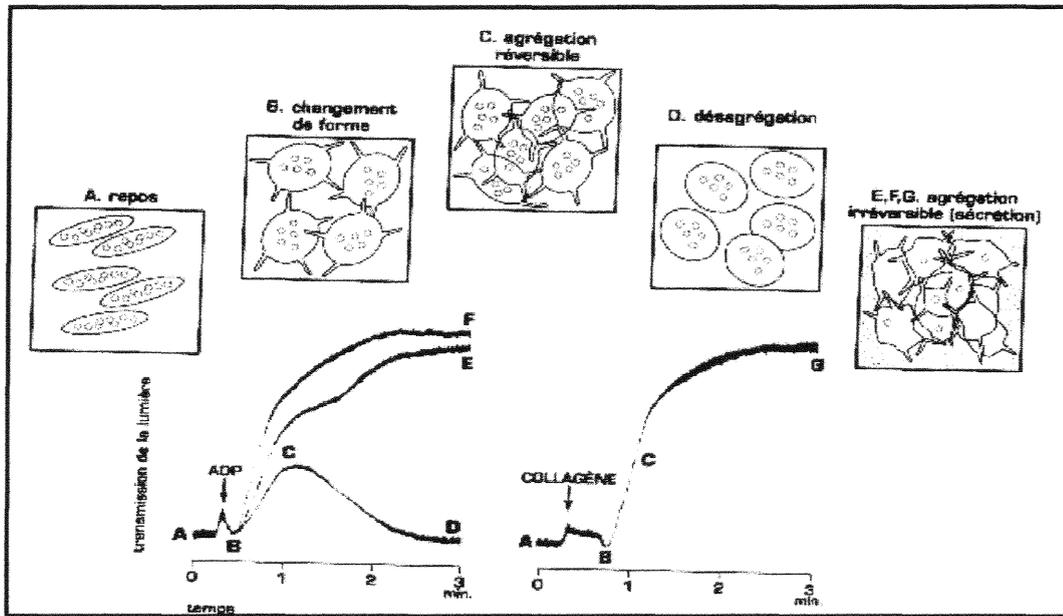


Figure 9 : courbes d'agrégation plaquettaire d'après Boneu B. (1).

L'addition d'une faible dose d'ADP ( $1 \mu\text{M}$ ) entraîne le changement de forme (B) puis leur agrégation réversible sans sécrétion (C). L'addition d'une forte dose d'ADP ( $2,5 \mu\text{M}$ ) s'accompagne, après la première phase d'agrégation, d'une deuxième vague qui correspond à la formation de thromboxane A2 et à la sécrétion du contenu des granules (E). Cette deuxième vague est inhibée par l'aspirine. A une concentration d'ADP de  $5 \mu\text{M}$ , les deux vagues sont fusionnées et l'agrégation qui s'accompagne de formation de thromboxane A2 et de sécrétion est irréversible (F). L'addition de fibre de collagène au PRP (G), entraîne l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène, puis après un temps de latence le changement de forme (B), puis l'agrégation qui s'accompagne de formation de thromboxane A2 et de la sécrétion plaquettaire.

## Activation plaquettaire (21)

### (*in vivo*)

Différents tests ont été utilisés successivement pour identifier une activation plaquettaire :

- ◇ dosage de la  $\beta$  thromboglobuline et du F4P dans le plasma (protéines contenues uniquement dans les granules alpha).
- ◇ dosage des métabolites du thromboxane A2 dans les urines.

(*in vitro*)

L'avènement de la cytométrie en flux et la possibilité d'utiliser un grand nombre d'anticorps monoclonaux ont permis de nouvelles approches pour identifier un état d'activation plaquettaire. Cette nouvelle technique permet la quantification par immuno-fluorescence des glycoprotéines membranaires.

Lors de l'activation, la plaquette subit des modifications morphologiques (fig 10). De discoïde, elle devient sphérique avec formation de pseudopodes résultants d'une réorganisation des protéines contractiles. La centralisation des organelles intracellulaires conduit à la fusion de leur membrane avec le système canaliculaire ouvert dont les canaux s'élargissent, permettant ainsi la sécrétion de substances biologiquement actives. Au cours de la sécrétion, la fusion des granules à la membrane plasmique conduit d'une part à l'augmentation du nombre de GPIIb/IIIa et d'autre part à l'expression de nouvelles protéines, telles que la GMP140 (P-sélectine), considérées comme marqueur des plaquettes activées.

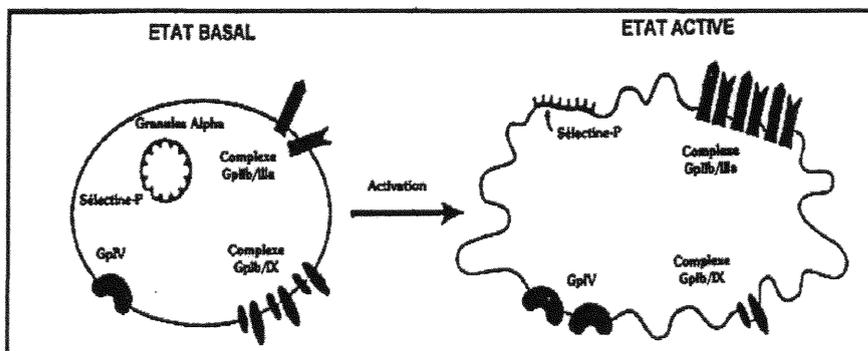


Figure 10 : représentation des principales glycoprotéines (Gp) sur les plaquettes au repos et après activation, d'après Nurden P. (21)

### **3.4. Mesure de la durée de vie**

Le marquage des plaquettes par un isotope,  $^{51}\text{Cr}$  (radiochromate de sodium) ou  $^{111}\text{Indium}$ , permet de mesurer la durée de vie des plaquettes autologues ou isologues dans la circulation. Grâce à l'imagerie, on peut évaluer leur séquestration dans le foie ou la rate et leur fixation vasculaire au niveau des lésions d'athérosclérose.

Remarques : Mis à part les tests pratiqués en routine dans les laboratoires d'hémostase, d'autres techniques sont mises en oeuvre plus occasionnellement pour mesurer des paramètres de sécrétion des plaquettes (sécrétion d'ADP et d'ATP par le test "luciférine-luciférase", sécrétion de la sérotonine marquée au  $^{14}\text{C}$ , ...), pour mesurer l'activité coagulante (activité prothrombinase), pour analyser la structure même des plaquettes (microscopie électronique), et juste pour les citer : mesure des mouvements calciques, exploration du métabolisme de l'acide arachidonique, étude des phosphorylations, ...

## 4. METHODES D'EVALUATION *IN VITRO* DES CONCENTRES PLAQUETTAIRES (4, 22)

Les nombreuses publications parues sur ce sujet depuis les quinze dernières années, se sont attachées à décrire une multitude de tests *in vitro*, permettant d'apprécier l'aspect fonctionnel des concentrés plaquettaires conservés, ainsi qu'à rechercher une corrélation satisfaisante avec la survie et la recirculation *in vivo*. Quelques publications exhaustives (22,23) permettent d'envisager un choix en fonction de l'objectif recherché et des nombreux paramètres pouvant affecter la qualité des plaquettes conservées, comme par exemple, les procédés d'obtention, de transformation, de conservation.

Ainsi peuvent être appréciés *in vitro* :

- la morphologie plaquettaire (indice de tournoiement, score morphologique, pourcentage de forme discoïde, allongement par changement de forme)
- les fonctions plaquettaires (adhésion, agrégation)
- l'état d'activation (glycoprotéines de membrane)
- la lyse plaquettaire (libération : LDH, sérotonine,  $\beta$ -thromboglobuline,...)
- l'activité métabolique (volume plaquettaire,  $PO_2/PCO_2$ , production de lactate, consommation de glucose)
- la mesure du pH
- le "choc osmotique"

Examens en  
Hémostase

Si, parmi les méthodes disponibles, la mesure du pH demeure le test le plus simple et le plus largement cité, les tests de morphologie plaquettaire apparaissent bien corrélés avec une efficacité *in vivo*.

Remarque : le tableau V résumant les différents tests utilisés est proposé page 45. D'après Murphy (23)

### 4.1. L'indice de tournoiement ou swirling

Basé sur l'inspection visuelle du concentré plaquettaire (24), à travers une source lumineuse, après un bref pincement du bord inférieur de la poche, le phénomène de tournoiement est lié à la présence de formes discoïdes dans la suspension plaquettaire. Des tentatives de quantification du degré d'homogénéité ont été proposées par Frantoni (25). Les approches instrumentales ne se sont pas avérées, jusqu'à présent, satisfaisantes (26).

## **4.2. Le test du score morphologique**

Décrit par Kunicki (27), ce test permet d'évaluer, grâce à un microscope à contraste de phase, le pourcentage de formes discoïdes, sphériques, dentritiques ou encore ballonnées, et d'en déduire une viabilité moyenne des concentrés (28). L'évaluation porte sur 100 plaquettes. Un facteur arbitraire (4, 2, 1, 0) est affecté à chaque pourcentage, le score maximum étant de 400. Aujourd'hui de nombreux laboratoires (23) quantifient uniquement le pourcentage de formes discoïdes sur une population de 100 ou 200 éléments. Avant d'être inclus dans un programme de contrôle de qualité de routine, ce test nécessite une standardisation, une formation et un entraînement régulier afin d'en accroître la fiabilité (test subjectif et technique fastidieuse).

Equipement requis : 1 microscope à contraste de phase équipé d'un objectif x100 à immersion.

## **4.3. Le test d'allongement par changement de forme ("*Extent of Shape Change*") (ESC)**

Ce test simple mis au point par S. Holme (13) enregistre grâce à un agrégamètre, la variation de densité optique d'une suspension plaquettaire, maintenue en agitation, après addition d'une solution d'ADP (1 mM). Il quantifie ainsi le passage de la forme discoïde à la forme sphérique.

## **4.4. Le contenu en ATP total**

Décrit également par S. Holme (13), ce test mesure l'ATP métabolique et granulaire par la réaction luciférine-luciférase, après extraction par une solution d'éthanol EDTA. La complexité du matériel d'analyse (agrégamètre avec canal de luminescence) limite, sans aucun doute, la généralisation de ce test dans les laboratoires de contrôle des services transfusionnels.

## **4.5. La mesure du volume plaquettaire moyen**

Utilisé comme test de routine par plusieurs équipes (29), cette méthode simple, rapide et standardisable, semble bien corrélée avec l'état d'activation plaquettaire. L'index PDW mesuré (correspondant à un coefficient de distribution en volume des plaquettes) est représentatif de la viabilité des plaquettes.

#### **4.6. Le dosage de substances sécrétées**

Le dosage de nombreuses substances (les plus courantes : sérotonine (30),  $\beta$ -thromboglobuline, LDH, P-sélectine soluble, lactate, ...) révèle l'état métabolique et l'intégrité de la membrane cellulaire. Par exemple, la quantification de la sérotonine dans le plasma (par marquage radioactif, et dosage photométrique) permet de déterminer une lyse cellulaire. Ces techniques sont assez fastidieuses à mettre en œuvre.

#### **4.7. Test d'évaluation par la lecture d'une transmission lumineuse à travers les poches de conservation.**

Cette technique (fig. 11) proposée par P. Järemo (31), contrairement aux autres méthodes, permet de déterminer la qualité d'un concentré sans risque de contamination.

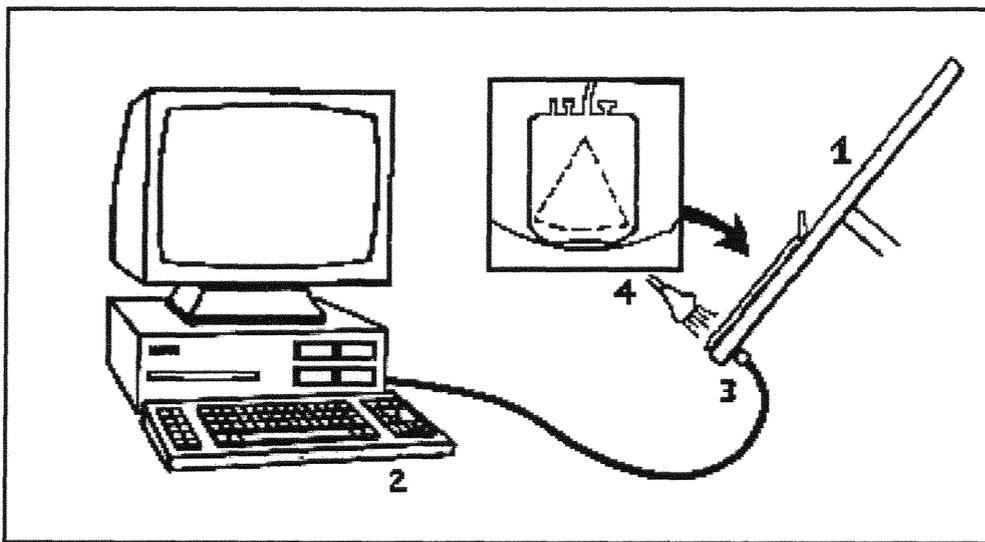


Figure 11 : mesure d'une transmission lumineuse à travers des concentrés plaquettaire, d'après Järemo P. (31).

(1 : disque oblique en aluminium animé d'un mouvement de rotation à 4 rpm, 2 : ordinateur, 3 : élément fixe récepteur de la lumière transmise, 4 : lampe halogène)

Les poches de concentrés plaquettaire sont disposées sur le plateau tournant, pendant toute la période de conservation. Régulièrement l'intensité lumineuse captée par l'élément photosensible est acquise et numérisée par un ordinateur. Les résultats pour chaque poche sont présentés sous la forme d'une courbe représentant la variation de transmission lumineuse en fonction du temps (conservation pouvant aller jusqu'à 7 jours).

L'augmentation de la transmission lumineuse semble correspondre à des modifications morphologiques et métaboliques des plaquettes. Ces résultats sont corrélés avec les principaux tests utilisés dans l'évaluation des concentrés (32).

#### **4.8. Les tests de la réponse osmotique des plaquettes**

Depuis une cinquantaine d'années, de nombreux auteurs ont tenté d'approcher les paramètres rhéologiques et le comportement morphologique des plaquettes placées dans des conditions d'hypotonie. Ces recherches font l'objet de la suite de ce document.

Tableau V : tests utilisés pour évaluer la qualité des concentrés plaquettaires ; d'après MURPHY (23) Recherche effectuée sur Medline pour la période janvier 1980 à septembre 1992 (199 publications).

Code (voir dessous)	Tests	Nb de publications qui font référence à chaque test
I	pH	127
I	Numération plaquettaire	118
V	% agrégation en réponse à un agent agrégeant	81
II	Réponse au Choc osmotique	57
VI	PO2	54
VI	PCO2	52
II	Morphologie par microscopie à contraste de phase	51
IV	Dosage du LDH dans le surnageant	50
III	Dosage de la bêta-thromboglobuline et du facteur 4 plaquettaire	48
VI	Concentration en lactate dans le surnageant	44
	Concentration en glucose dans le surnageant	39
I	Concentration en leucocytes	36
I	Volume moyen plaquettaire	29
IV	Dosage de la sérotonine dans le surnageant	26
II	Dosage de l'adénosine triphosphate des plaquettes	20
II	Morphologie par microscopie électronique	19
I	Distribution en taille des plaquettes	17
III	Expression de la glycoprotéine Ib plaquettaire	16
II	Extent of shape change en réponse à un agent	15
	Dosage de l'adénine nucléotide des plaquettes	12
	Estimation objective de la forme discoïdale (pas par microscopie)	10
III	Expression des glycoprotéines plaquettaires IIb - IIIa	10
	Dosage de la thromboxane- B2 dans le surnageant	9
III	Expression de la P-sélectine	8
I	"Swirling" de concentrés évalué par une inspection visuelle	4

Caractéristique de l'exploration	code attribué
Méthodes les plus pratiquées pour le contrôle de qualité	I
Mesures corrélées avec la viabilité <i>in vivo</i>	II
Mesures reflétant l'activation plaquettaire	III
Mesures reflétant la lyse plaquettaire	IV
Mesures reflétant la fonctionnalité des plaquettes	V
Mesures reflétant l'activité métabolique des plaquettes	VI

## 5. **ETAT DES LIEUX**

La plaquette présente une physiologie particulière. Ses principales fonctions dans la circulation et dans l'organisme sont de façon générale bien connues à ce jour. Elle reste cependant délicate à étudier car elle est caractérisée par une fragilité due à une activation facile. Toutes les techniques d'études des fonctions et de la viabilité des plaquettes doivent être réalisées rapidement après le prélèvement (moins de 2 heures, voire 3 suivant la recherche de paramètres effectuée).

Sa structure membranaire autorise des échanges entre le milieu intra et extra-cellulaire, principalement au niveau du passage de l'eau et des ions par le phénomène d'osmose. Certains constituants propres à la plaquette : système canaliculaire ouvert (SCO) et système tubulaire dense (STD), permettent des modifications morphologiques et des gonflements osmotiques importants. D'autres comme les microtubules ou les microfilaments jouent un rôle de régulation des formes et du volume.

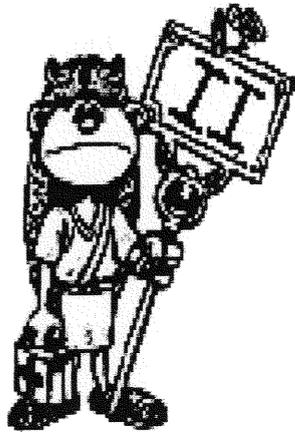
Les examens de routine pratiqués dans les services d'exploration de l'hémostase, après une numération systématique sur un compteur automatique, caractérisent en premier lieu la fonction d'agrégabilité des plaquettes, propriété indispensable à l'arrêt des hémorragies.

Pour lutter contre certaines pathologies hématologiques (leucémies, ...), pour combler un déficit en plaquettes de certains malades (réanimation, chimiothérapie, ...), il est nécessaire de disposer de concentrés plaquettaires fiables. Du prélèvement sur donneurs bénévoles à la mise en disposition pour un patient, il est impératif de contrôler les différentes étapes de préparation de ces concentrés. Les trois éléments qui semblent essentiels sont : la technique de séparation (centrifugation, filtre) utilisée en aphérèse par les machines automatiques, les poches de conservation (matériaux), et le type de conservation (agitation et température). Le délai usuel maximum de conservation est de cinq jours.

Le point primordial pour une transfusion efficace, est de contrôler au préalable la qualité du concentré plaquettaire proposé. Actuellement les tests pratiqués les plus régulièrement se limitent à une mesure du pH, à la visualisation du phénomène de tournoiement (lié au mouvement des plaquettes de morphologie normale), à la numération, voire une éventuelle contamination.

Il paraît donc important de disposer d'un test de routine et de référence pour caractériser la viabilité des plaquettes conservées.

La proposition d'un test simple et automatique de l'étude du comportement osmotique des plaquettes, permettra certainement d'envisager une standardisation pour le contrôle de qualité de ces produits.



# *La Résistance Osmotique des Plaquettes*

## **1. INTRODUCTION**

L'étude de la résistance osmotique plaquettaire présente des difficultés dues à la labilité de ces éléments avec des surfaces étrangères dans les phases de leur séparation. De plus, il n'existe pas de technique de laboratoire suffisamment sensible au degré de lyse des plaquettes, contrairement à ce qui est possible pour les érythrocytes dont la lyse est démontrable par le phénomène bien défini de l'hémolyse (mesure du taux d'hémoglobine libéré).

Les premiers travaux de Minot et Lee (1916), Howell et Cekada (1926), Fonio (1932), s'étaient attachés à constater une plus grande stabilité, en solutions hypotoniques, des plaquettes hémophiliques par rapport aux plaquettes normales. Plus que les caractéristiques de l'hémophilie (avec une certaine réserve, travaux datant du début du siècle), il est à noter que la mesure de la résistance osmotique était déjà proposée pour tenter de distinguer certaines pathologies.

De nombreux auteurs ont décrit des techniques pour apprécier le comportement de la plaquette soumise à une contrainte hypotonique (voir hypertonique), et pour caractériser une viabilité cellulaire dans des conditions hématologiques différentes (conservation, congélation, cryopréservation, ...).

L'analyse de l'historique respectera un ordre chronologique par rapport aux dates de publications des différents travaux. Chaque travail sera présenté en un paragraphe décomposé comme suit : Nom de l'auteur, année de publication, bref descriptif des matériels et méthodes, suivi des résultats significatifs.

## 2. HISTORIQUE

### 2.1. Recherche d'un test

**OLEF en 1936** (33) a observé à l'aide d'un **microscope optique à contraste de phase**, à des intervalles de temps réguliers, la lyse des plaquettes soumises à des solutions de sodium métaphosphate. Avec cette méthode, il a examiné des plaquettes de sujets sains et de sujets présentant des pathologies diverses.

**GRAM et LOUS en 1939** (34) ont incubé des plaquettes dans des solutions de concentrations en sels différentes (de 9 g/L à 2 g/L de NaCl). Les auteurs ont ensuite compté par observation sous **microscope optique à contraste de phase** les plaquettes lysées. Ils ont constaté qu'à partir d'une concentration de 3 g/L de NaCl les plaquettes s'agglutinent en masse compacte et libèrent de nombreux granules.

**MUHRER et coll. en 1944** (35) a étudié le **taux de libération de thromboplastine** par des solutions de PRP (obtenu à partir du sang de porc, anticoagulant trisodium citrate) d'ionocité décroissante (10 tubes, 0 g/L  $<[\text{NaCl}] < 2,5$  g/L). La mesure du temps de coagulation du plasma recalcifié pour les différents tubes est influencée par le taux de thromboplastine libérée (plus la concentration en sels est faible, plus le nombre de plaquettes lysées est grand, plus la quantité de thromboplastine libérée est grande, et plus le temps de coagulation est court). Ce temps a été proposé comme index de l'état de fragilité des plaquettes.

**DAY en 1947** (36) (même méthodologie que MUHRER, mais avec du sang humain, anticoagulant sodium citrate) a montré que le temps de coagulation était quantitativement en relation avec la **vitesse de formation de thrombine**, laquelle était dépendante de la quantité de thromboplastine libérée par les plaquettes. Le PRP exposé à des solutions hypotoniques se coagule plus vite que du plasma normal ; cela est dû à une lyse plus complète des plaquettes. L'auteur a également observé qu'initialement les plaquettes ont tendance à former des agrégats de 5 à 10 cellules pour une concentration saline inférieure à 3,4 g/L (avec apparition des premiers "ghosts" cellulaires). Pour une concentration en sels inférieure à 3-2,2 g/L, les plaquettes sont lysées.

**GUREVITCH et coll. en 1956** (37) a étudié 50 échantillons de plaquettes de donneurs sains (préparés à partir de sang total, anticoagulant disodium sequestrene Triton). Chaque échantillon a été incubé dans 20 tubes contenant des solutions d'ionicités différentes comprise entre 6 g/L et 2,2 g/L de NaCl. La mesure du **taux de sérotonine libérée** et l'observation au **microscope optique à contraste de phase** lui a permis de définir différents seuils : la fragilité débute à une concentration saline de 4,4 g/L et est complète à 3,4 g/L. Il a observé les modifications morphologiques des plaquettes passant d'une forme initiale quasi normale (la majorité des cellules sont uniformes en taille) à une forme plus sphérique (4 g/L < [NaCl] < 6 g/L). Ensuite, les plaquettes s'élargissent tout en laissant apparaître des spicules (observation de fines granules à l'intérieur des cellules, [NaCl] < 4,4 g/L). Puis, des excroissances de plus en plus nombreuses (claires, longues et sans granulation) entourent les plaquettes pour une concentration inférieure à 3,8 g/L. L'auteur a noté que le taux de libération de sérotonine augmente avec la décroissance de la concentration saline des solutions. En **1958** (38), l'auteur a précisé ses travaux en observant de nombreux matériels de la cellule dans le milieu extra cellulaire pour des concentrations en sels faibles.

**INTROZZI et DE NICOLA en 1956** (39), ont établi le degré de résistance plaquettaire en étudiant les modifications de **l'activité thromboplastique** des plaquettes isolées à une concentration constante et mises en suspension dans des solutions hypotoniques de chlorure de sodium (à des titres décroissants). Parallèlement, les auteurs ont procédé à l'étude **thrombélastographique** des suspensions plaquettaires, au moyen du relief de la réduction progressive de l'amplitude maximale du thrombélastogramme qui, en exprimant la résistance des filaments de fibrine à la traction et étant principalement conditionnée par l'activité fonctionnelle plaquettaire, n'atteint des valeurs normales que lorsque les plaquettes sont intactes, et diminue progressivement à mesure de leur lyse.

**BASERGA et coll. en 1957** (40) a déterminé, par la mesure de **l'activité thromboplastique** (sur du plasma débarrassé de plaquettes et recalcifié, préparé à partir de sang total prélevé sur séquestrène) et par l'observation des **modifications morphologiques en microscopie optique à contraste de phase**, des seuils de résistance : minimal compris entre 4 et 3,6 g/L et maximal compris entre 3,2 et 2,8 g/L NaCl. L'auteur a également constaté la diminution de l'indice **turbidimétrique** d'une solution de PRP d'ionicité décroissante (**mesure photoélectrique**), et a proposé cet indice comme facteur de la lyse plaquettaire. L'auteur a étudié le comportement de la résistance osmotique dans quelques conditions pathologiques.

**ULUTIN et coll. en 1959** (41), en mesurant le **taux de libération de la thromboplastine** pour un PRP placé dans 7 tubes d'ionicités différentes (de 6 à 1 g/L de NaCl), a montré une augmentation de la résistance des plaquettes pour une thrombopathie de Willebrand du type Jürgens.

**NELKEN et coll. en 1960** (42) a associé les observations réalisées en **microscopie optique et en microscopie électronique** pour distinguer deux formes caractéristiques des plaquettes soumises à une force osmotique : cellules avec protusions (dendrites) et "ghosts". De plus, la diminution de la concentration en électrolytes minéraux entraîne une augmentation **du taux de libération de l'enzyme pyrophosphatase**. A partir d'une concentration de 4,4 g/L de sels, les premières cellules composées de dendrites apparaissent ; l'optimum se situant vers 3 g/L, pour ensuite diminuer et ne laisser qu'une forte majorité de "ghosts" (ombre cellulaire, totalité pour [NaCl] < 1 g/L). Les courbes correspondant au pourcentage de "ghosts" et au taux de libération de pyrophosphatase en fonction de la concentration saline montrent une certaine similitude. L'auteur a montré que pour des thrombopathies, la fragilité osmotique est diminuée. **DANON en 1961** (43), a poursuivi cette étude en comparant deux techniques pour provoquer la contrainte osmotique : **méthode progressive par dialyse et méthode "drastic"** (ajout direct d'une solution PRP à une solution de NaCl). Les modifications morphologiques sont similaires avec les deux techniques, seuls les pourcentages des différentes formes varient à une concentration donnée. Pour une concentration de 2,5 g/L de NaCl, la **libération de pyrophosphatase** est importante par la technique "drastic" et nulle par dialyse. L'analyse repose également sur la possibilité d'un retour à l'état initial des cellules après une contrainte osmotique, ainsi seule la technique par dialyse permet une réversibilité car la membrane des plaquettes peut endurer de grandes déformations si la décroissance des ions NaCl se fait progressivement. **NELKEN en 1961** (44) a précisé l'idée de réversibilité en montrant que les plaquettes peuvent retrouver leur forme originale par retour dans une solution isotonique si la contrainte hypotonique appliquée au préalable n'excède pas 3,4 g/L de NaCl. La cellule est très élastique, mais pour des solutions de NaCl de 2,4 g/L ou d'une concentration encore plus faible, les thrombocytes sont incapables de reprendre la forme primitive et se décomposent en "ghosts" cellulaires.

**ROGNER en 1963** (45) a proposé une détermination de la résistance osmotique des plaquettes basée sur des **mesures photoélectriques** (longueur d'onde comprise entre 490 et 540 nm, 12 solutions de PRP variant de 8 à 1 g/L NaCl). L'altération osmotique des plaquettes commence à une

concentration de 4,5 à 3,5 g/L de NaCl et se maintient pour des concentrations plus faibles de NaCl jusqu'à l'eau distillée. Des concentrations de 300 à 500 .10<sup>9</sup> plaquettes/ L sont les plus favorables pour cette méthode. L'auteur a remarqué que les plaquettes deviennent de plus en plus transparentes dans des milieux d'hypotonie croissante.

**FANTL en 1968 (46)** a observé une **diminution de l'absorbance** d'une solution de PRP en milieu hypotonique à **610 nm** (par gonflement des cellules, entrée rapide de l'eau dans les plaquettes) et une augmentation de l'absorbance en milieu hypertonique (rétrécissement des cellules, l'eau s'échappe des plaquettes). Les plaquettes intactes physiquement et biochimiquement régulent leur volume dans des conditions d'hypotonie. L'auteur a remarqué une diminution puis une augmentation de l'absorbance pour une hypotonie limitée (gonflement, puis retour à un état initial).

**ZHAHVI et coll. en 1970 (47)** a proposé la **mesure automatique** de la fragilité osmotique des plaquettes à l'aide du **Fragiligraph** (dialyse contre une solution tampon à 1 g/L de NaCl permettant une diffusion progressive des ions NaCl, mesure de la transmission lumineuse à travers l'échantillon de plaquettes lavées suspendues dans le chlorure de sodium physiologique tamponné par le véronal, le TRIS ou le phosphate). La vitesse moyenne de l'altération des plaquettes et l'augmentation de la transmission de la lumière mettent en évidence trois phases : la première correspondant à une évolution lente d'une durée de 2-74 s suivie d'une phase caractérisée par une altération rapide (gonflement progressif des plaquettes), et une dernière phase où un plateau est atteint. La vitesse moyenne de gonflement des plaquettes dépend de la température, 2 fois plus élevée à 37°C qu'à 15°C.

**KIM et coll. en 1970 (48)** a réalisé une **mesure de l'absorbance** de solutions de PRP ajoutées à des solutions hypotoniques (dilution ½) à 420 nm dans un spectrophotomètre (pic d'absorbance au bout d'une minute : gonflement, puis remontée progressive du signal lumineux correspondant à un retour à une morphologie cellulaire initiale quasi normale, dépendante de la température). L'auteur a conforté ces résultats lors d'une étude de conservation **en 1974 (49)** en démontrant que la réaction de réversibilité est un indicateur *in vitro* précis pour caractériser la viabilité *in vivo* des plaquettes conservées (application à la cryopréservation).

**LUNBERG et coll. en 1972 (50)** a observé la réponse des plaquettes soumises à une contrainte hyper et hypo-osmotique pour deux températures de conservation 37°C et -5°C ; **par un dosage du potassium, de la sérotonine et par l'étude de la rétraction du caillot** (suspension témoin de PRP diluée au tiers avec de l'eau distillée, référence : suspension de PRP diluée au tiers avec de l'eau physiologique, anticoagulant : ACD). L'auteur a montré que dans des conditions d'hypotonie les

plaquettes perdent leur soluté (potassium et sérotonine par exemple) pour les deux températures (-5 et +37°C), sans dommage apparent de leurs fonctions.

**VIGNERON et coll. en 1972 (51)** a essayé d'apprécier à partir de plaquettes lavées (sang total prélevé sur EDTA) soumises à un choc hypotonique d'intensité croissante le degré de lyse, par la **mesure du taux de libération des protéines plaquettaires, de la phosphofructokinase, de la pyruvate kinase, de lactate deshydrogénase, de leucine aminopeptidase, de la pyrophosphatase inorganique** et par l'utilisation du **Fragiligraph (ZAHAVI)**. Une courbe moyenne (50 témoins) représentant le degré de lyse en fonction de la concentration saline montre que la lyse initiale se produit à 5 g/L de NaCl. L'auteur a proposé ce test pour l'étude physicochimique de la membrane plaquettaire, des thrombopathies et pour le suivi de la viabilité en fonction de la méthode de conservation.

**KAHN et coll. en 1973 (52)** a déterminé le volume minimal critique (35%) des plaquettes à 37°C dans des solutions hypertoniques (un volume de PRP pour deux volumes de solution saline, anticoagulant : ACD), par la **mesure des volumes moyens, du dosage de la sérotonine libérée, du potassium**, et par l'utilisation d'un **agrégamètre**. Le volume des plaquettes décroît avec l'hypertonie et retrouve son état initial si le seuil critique n'est pas dépassé. La limite du point de vue morphologique correspond à un équilibre des concentrations en sels entre l'intra et l'extracellulaire. L'auteur a constaté, pour des plaquettes placées à -5°C et ensuite exposées à une solution hypertonique, que la résistance au rétrécissement en taille est plus importante.

**HARDEMAN et coll. en 1974 (53)** a étudié la conservation à +4, +25 et +37°C des plaquettes par deux tests de viabilité correspondant au **dosage de la sérotonine** et à la **réponse au choc hypotonique** (technique FANTL avec analyse plus poussée des courbes, critère retenu : **pente maximale du signal**). Les courbes correspondant à la concentration plaquettaire, à la libération de sérotonine et à la pente du signal de transmission lumineuse, toutes trois fonction du temps de conservation, permettent l'analyse de l'intégrité plaquettaire. La corrélation entre le taux de libération de la sérotonine et le choc osmotique est bonne. Les deux propriétés se maintiennent le mieux à 25°C. L'anticoagulant EDTA donne l'activité cellulaire la plus basse spécialement après conservation.

**ODINK en 1976 (54)** à partir de la **technique de FANTL** a proposé un indice pour caractériser la réponse des plaquettes au choc hypotonique (anticoagulant : ACD, PRP dilué au tiers

avec de l'eau distillée) : **rapport** (indépendant de la concentration plaquettaire) entre la **vitesse maximum de normalisation  $V_{max}$**  et la **diminution initiale  $A_{min}$**  (chute rapide du signal de transmission). Les cryoprotecteurs altèrent cette réaction à l'hypotonie. La cryopréservation provoque une diminution de l'absorption lumineuse des suspensions de plaquettes, de  $A_{min}$  et du processus de normalisation. L'auteur **en 1977 (55)** qui a remarqué que cet indice était corrélé avec la mesure de **l'activité de la sérotonine**, a proposé qu'il soit utilisé pour évaluer la méthode de conservation des plaquettes (dont la cryoconservation).

**SUMMERER et coll. en 1978 (56)** a observé en parallèle la mesure par **transmission lumineuse (FANTL, dilution 1/3)** et la mesure de la **distribution en taille** des plaquettes soumises à un choc hypotonique, principalement dans la phase de réversibilité (tests effectués sur des concentrés plaquettaires). Une corrélation significative entre les deux techniques confirme l'analyse proposée : gonflement immédiat des cellules, puis rétrécissement progressif avec extrusion de l'eau intra-cellulaire. Cette variation de lumière transmise à travers un échantillon de plaquettes est due à des fonctions complexes : la densité des cellules, la forme, le volume, la diffusion sur les membranes, ...

**LAW en 1983 (57)** a déterminé les limites osmotiques que peuvent endurer les plaquettes, en plaçant des solutions de PRP (anticoagulant : citrate-phosphate-dextrose CPD) dans des tubes à dialyse, eux-mêmes plongés dans une solution non isotonique à température ambiante. L'étude correspondant à **l'observation morphologique** des cellules après retour dans une solution isotonique, permet de distinguer 4 groupes morphologiques : disques (pour la majorité des plaquettes fraîches), sphères (après réfrigération ou conservation à température ambiante), dendrites (développement de pseudopodes), formes complexes. Les plaquettes sont donc endommagées par un stress hypo ou hypertonique à température ambiante. Cette analyse est confortée par deux autres méthodes : **paramètres d'agrégation** et test de fragilité osmotique (FANTL, 610 nm, 0,6 mL de PRP dans 0,4 mL d'eau distillée). Le test de fragilité osmotique révèle une distinction entre des plaquettes saines et anormales.

**WATANABE et coll. en 1983 (58)** par l'utilisation d'un nouvel appareil de numération et de calcul de volume en continu, a examiné les propriétés de la membrane des plaquettes dans des conditions d'hypotonie (mesure, avec un échantillonnage compris entre 2 et 200 s., du volume moyen pendant le choc osmotique; anticoagulant : ACD). Les **variations de volume** des cellules sont corrélées à la **"réponse au choc osmotique"** (FANTL) pour différentes contraintes hypotoniques.

**ARMITAGE et coll. en 1985 (59)** a étudié l'effet d'une contrainte osmotique sur des plaquettes à 0, 25 et 37°C par la technique **FANTL** (0,8 mL de PRP mélangé à 0,4 mL d'eau distillée, anticoagulant CPD) avec le **calcul d'un nouvel indice : pourcentage de réversibilité  $R = 100(T_m - T)/(T_m - T_b)$**  avec  $T_m$  : amplitude maximale de la transmission après addition de l'eau,  $T$  : amplitude de la transmission 10 minutes après,  $T_b$  : amplitude après 10 minutes pour la solution référence PRP diluée avec de l'eau isotonique. La contrainte osmotique est un facteur utile pour étudier l'effet des cryoprotecteurs comme le glycérol.

**EGGER et coll. en 1986 (60)** a étudié la perméabilité des membranes plaquettaires par électro-rotation suivant une contrainte hyper ou hypotonique. La diminution du signal d'électro-rotation au niveau des lipides intra-membranaires se corrèle avec la lyse progressive des plaquettes provoquée par une diminution en sels du milieu, et donc avec l'augmentation de l'agrégation due aux phénomènes de libération des activateurs.

**FARRUGIA et coll. en 1989 (61)** a déterminé un indice R.S.H. (Réponse au Stress Hypotonique) correspondant à **la différence à 1 minute et à 3 minutes du signal de transmission lumineuse** (414 nm) à travers une solution de PRP (500 µL de PRP, + 500 µL d'eau distillée à  $T=0$ , anticoagulant CPD). Cette technique montre une relation entre le pH et la viabilité des cellules ; l'indice calculé est un critère pour le contrôle de qualité.

**DAVIS et coll. en 1992 (62)** a incubé des solutions de PRP issu d'un prélèvement de sang total sur EDTA à différentes concentrations salines. Les données recueillies en terme **de nombre, de volume et par observation microscopique** montrent des modifications en taille, particulières et reproductibles, des plaquettes.

## **2.2. Bilan de ces recherches**

De nombreux travaux publiés sur le comportement des plaquettes en milieu hypotonique ont tenté de standardiser des tests permettant d'apprécier la résistance osmotique de cette cellule *in vitro*. Chaque technique est basée sur la mesure ou l'observation du phénomène soit après incubation de PRP dans des solutions d'ionicités différentes, soit dès le "choc osmotique", soit en continu avec un processus de dialyse.

*Ces travaux ont principalement porté sur :*

- le comportement osmotique des plaquettes (33). Ainsi à partir d'une concentration ionique de 3 g/L de NaCl, il a été constaté que les plaquettes s'agglutinent et libèrent le contenu de nombreuses granules (34). Parallèlement, l'observation de la modification morphologique des plaquettes (en microscopie optique à contraste de phase ou en microscopie électronique) montre qu'à partir de 4,5 g/L de NaCl des dendrites apparaissent (37,38,42). En dessous de 3 g/L de NaCl, des débris cellulaires sont observés. Cependant, les plaquettes ne sont pas uniquement capables de tolérer des changements de forme suivant l'hyponicité, mais aussi de gonfler avant rupture (57), tout en résistant à l'entrée d'eau. (62). Par ailleurs la détermination d'un indice turbidimétrique reflète le changement de forme et la lyse cellulaire (40) ;
- la mesure de l'agrégation photométrique des plaquettes soumises au préalable à un choc osmotique (52,57), qui met en évidence une corrélation entre le pourcentage de cellules lysées et la diminution du temps d'agrégation spontanée ;
- le dosage de substances libérées par les plaquettes au cours du choc osmotique : sérotonine (53,55), LDH (51),  $\beta$  thromboglobuline (71), pyrophosphate (43), potassium (50) ;
- les variations de densité optique (D.O.) du PRP en milieu hypotonique (45). Ainsi les variations de D.O. après l'addition d'eau ("choc" osmotique correspondant à concentration ionique de 6 g/L de NaCl) à différentes longueurs d'ondes : 610 nm (46) et 420 nm (49), permettent d'observer un gonflement rapide des cellules ( $t < 1$  min), puis un retour à un état quasi initial ( $t < 10$  min). L'analyse de la courbe par le calcul des rapports d'amplitude à des temps différents, permet une caractérisation indirecte de la viabilité cellulaire (59,54) ;
- la numération et la mesure du volume cellulaire. La numération cellulaire permet de déduire le pourcentage de lyse des plaquettes, suivant le choc osmotique (56,62). La mesure du volume moyen permet également d'apprécier les modifications morphologiques induites par le "choc" et de définir des indicateurs de viabilité (61) ;

Depuis le début du siècle, le comportement osmotique des plaquettes placées en hypotonie démontre donc un intérêt particulier pour caractériser des pathologies, pour évaluer une viabilité des cellules après certains traitements et principalement après différentes techniques de conservation.

Quelques travaux ont également tenté de montrer une corrélation entre les paramètres du choc osmotique et différentes fonctions plaquettaires (53,55). La complémentarité entre des observations microscopiques, les dosages de produits de sécrétion, des mesures d'absorbance, permet de caractériser avec plus de précision la résistance des plaquettes à une contrainte hypotonique.

De l'observation simple au microscope (analyse des modifications morphologiques), au dosage des substances libérées (détermination du pourcentage de lyse), ..., le test dit "réponse au choc osmotique" s'est imposé comme la technique la plus simple à utiliser et à interpréter. La présentation des résultats, pour définir l'indice le plus en adéquation avec la viabilité des plaquettes, n'a cessé d'évoluer par la qualité des appareils utilisés, la technique de préparation, et par la proposition de calculs des pentes, des amplitudes, ... .

### 3. "REPONSE AU CHOC HYPOTONIQUE" R.C.H.

Le test dit "réponse au choc hypotonique" à 610 nm (initié par ROGNER, puis proposé par FANTL) reste la technique la plus souvent utilisée pour étudier le comportement des plaquettes dans des situations transfusionnelles ou hématologiques.

Pour cette technique, l'unité choisie pour exprimer la pression osmotique ne sera plus la concentration ionique en NaCl définie en g/L, mais la force ionique définie en Molaire (le système de correspondance est détaillé au § 2-1-1, p68).

#### 3.1. Principe de la technique

La technique consiste à observer le comportement des plaquettes lorsque celles-ci subissent un choc hypotonique. Généralement, un volume  $V$  de PRP d'une concentration cellulaire voisine de  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L est placé dans deux micro-cuves. Ces dernières sont introduites dans un spectrophotomètre, une voie est utilisée comme référence et l'autre voie sert au test (fig 12). La longueur d'onde est fixée à 610 nm. Simultanément (pour un spectrophotomètre deux voies), deux mesures sont effectuées :

- pour la voie dite "référence", la mesure de la densité optique (DO) après addition dans la micro-cuve correspondante d'un volume  $v$  d'eau physiologique (0,155 M) est réalisée. La courbe obtenue servira de ligne de base pour l'étude du gonflement des plaquettes ;
- pour la voie dite "test", la mesure de la densité optique après addition dans la micro-cuve correspondante d'un volume  $v$  d'eau distillée (0 M) est effectuée. La courbe enregistrée reflète l'évolution de DO entre les deux cuves.

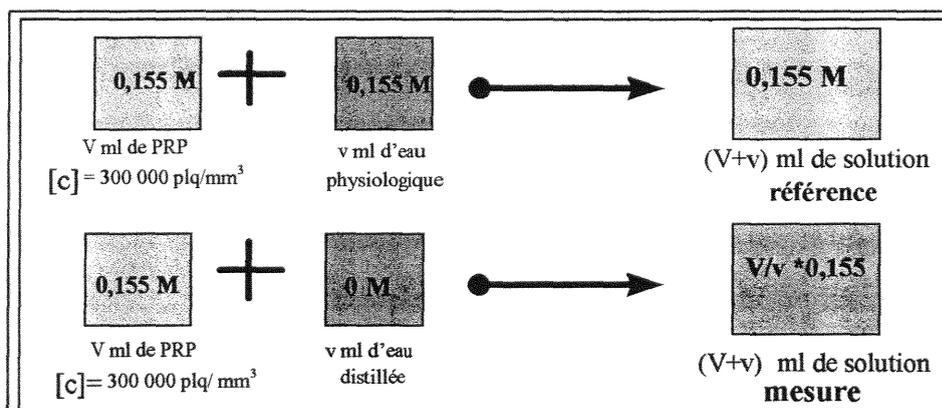


Figure 12 : schéma représentant la technique préparatoire au choc hypotonique. Par exemple : la dilution utilisée est généralement de 1/2 ou 1/3, soit une force ionique de 0,075 ou 0,1 M.

Remarque : pour un spectrophotomètre mono-voie, la technique est la même avec des mesures consécutives.

La variation de transmission lumineuse (fig 13) à travers l'échantillon test correspond à des modifications de formes et de volumes des plaquettes en réponse à la chute de l'osmolarité.

Suivant le spectrophotomètre choisi ou les cuves de mesures utilisées, les volumes peuvent varier de 500 µl à 1 ml pour V (PRP) et v. Sachant que les dilutions effectuées sont de 1/2 ou 1/3 pour provoquer le choc osmotique (dilution 1/2 : force ionique finale de 0,075 M, dilution 1/3 : force ionique finale de 0,1 M).

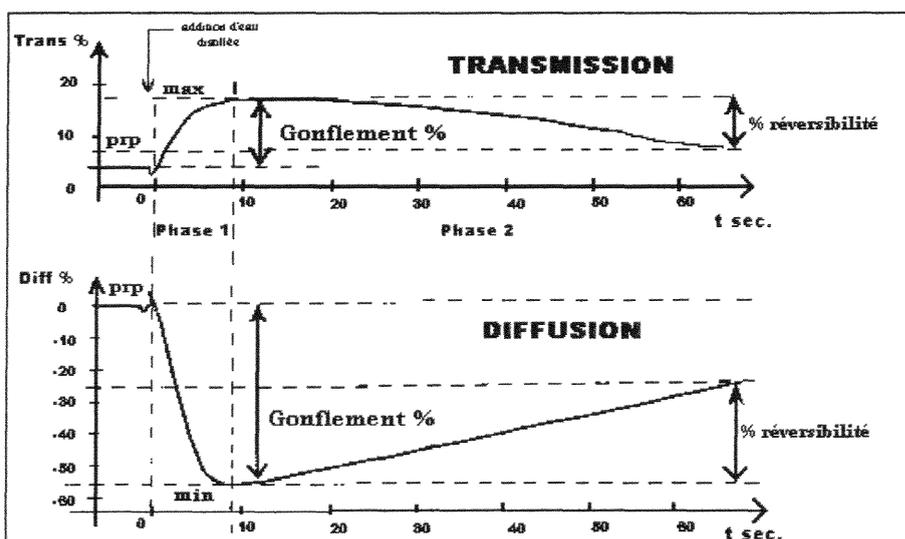


Figure 13 : courbes obtenues en transmission et en diffusion pour le test de RCH (PRP de  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L) d'après travaux de JUNG (76).

#### Analyse des courbes :

L'analyse de la courbe de transmission lumineuse à travers le PRP, pendant le choc osmotique, consiste à déduire des critères de quantification du pourcentage de plaquettes viables. Après un gonflement rapide dès l'injection de l'eau distillée (fonction de la dilution), les plaquettes luttent contre l'influx d'eau et, par un système de "régulation", tentent de retrouver une forme initiale discoïdale. C'est par un rapport d'amplitude, synonyme du pourcentage de réversibilité, à deux temps caractéristiques (par exemple : temps où le gonflement est maximum, et temps au bout de 1 minute dans le cas de la figure ci-dessus) qu'un indice est calculé. Ce dernier est corrélé à la viabilité des plaquettes testées.

La particularité de ce test repose sur le fait que la courbe est tracée de façon automatique, mais l'interprétation des résultats, quant aux critères choisis pour étudier la résistance osmotique, passe par une procédure de calcul basée sur une analyse visuelle et un traçage manuel.

Ce test est pratiqué depuis une vingtaine d'année pour étudier la viabilité des plaquettes.

### **3.2. Utilisation du test "Réponse au Choc Osmotique"**

Depuis la validation du test RCH par corrélation des résultats avec d'autres techniques (HARDEMAN 1974, ODINK 1976 (V), SUMMERER 1978), des auteurs l'ont utilisé pour étudier la viabilité des plaquettes placées dans des conditions diverses (congélation, cryopréservation, conservation, ...).

Une suite de travaux traitant de l'utilisation du test RCH est présentée ci-après, en fournissant le nom de l'auteur, l'année, et un bref descriptif des résultats.

**HANDIN et coll. en 1970 (63)** a étudié la réponse des plaquettes soumises à un stress osmotique, suivant une conservation à 4°C et 22°C (à 24, 48 et 72 heures). Le test RCH est utilisé pour étudier les plaquettes (anticoagulant : acide-citrate-dextrose : ACD). L'auteur a ainsi constaté qu'après 72 heures les plaquettes conservées à 22°C retiennent leur capacité de réversibilité après gonflement osmotique, et par contre que les plaquettes conservées à 4°C montrent un rapide déclin quant à la faculté de retour à une forme initiale.

**JAISSON et coll. en 1974 (64)** a essayé d'apprécier l'aptitude des plaquettes à la recirculation immédiate après transfusion par le test RCH. La mesure de la transmission lumineuse montre une augmentation extrêmement rapide du signal dans les premières secondes qui suivent la création de l'hypotonie (gonflement, augmentation de volume), puis une phase de réversibilité qui requiert de l'énergie, une certaine intégrité de la membrane. A l'issue d'une étude portant sur 80 PRP normaux, l'auteur a évalué l'intérêt transfusionnel éventuel de ce test.

**LECOMPTE et coll. en 1985 (65)** a effectué une comparaison de critères fonctionnels plaquettaires étudiés *in vitro* par l'agrégation à différents agents, le test RCH, la teneur en ATP, et l'évaluation des distributions des volumes au cours de la conservation des plaquettes pendant 6 jours dans un nouveau type de matériel plastique. Le test RCH permet d'évaluer selon l'auteur la qualité *in vitro* des concentrés plaquettaires dont le pH s'est maintenu supérieur à 6, sans préjuger pour autant de leur valeur transfusionnelle.

**BRODTHAGEN et coll. en 1985 (66)** et **KIM en 1986 (67)** ont utilisé le test RCH pour mesurer l'incidence d'une cryoconservation avec le glycérol sur la viabilité des plaquettes. BRODTHAGEN a observé l'intégrité membranaire des plaquettes par comptage, par une étude de taille, par agrégation au collagène, et par la technique "RCH" qui s'est avérée la plus sensible ; il en a déduit un protocole minimisant le stress engendré par le glycérol.

**SNYDER et coll. en 1991 (68)** a mesuré l'incidence d'une irradiation d'Ultra Violet B sur des concentrés plaquettaires (pour une allo-immunisation) sur la viabilité des cellules. Par une corrélation entre le test RCH et le score morphologique, l'auteur a vérifié qu'une dose de 10000 mJ/cm<sup>2</sup> ne détériore pas les plaquettes après 24 à 48 heures de conservation.

**SHIMIZU et coll. en 1992 (69)** avec le test RCH, a mesuré le pourcentage de réversibilité de solutions de PRP conservés (dilution ½ avec eau distillée). L'addition d'une solution contenant du glucose avec un pH physiologique (effet de stabilisation au niveau de la membrane) semble être importante pour une conservation optimale.

**TURNER et coll. en 1994 (70)** a considéré que le test RCH est un bon indicateur *in vitro* de la viabilité après transfusion (suivie de conservation de PRP sur 5 jours).

**KOERNER et coll. en 1994 (71)** a étudié trois produits différents de synthèse sans glucose pour la conservation des plaquettes. Les tests utilisés étaient l'agrégation, la réponse au choc osmotique (RCH) et la libération de la  $\beta$ -TG, F4P et la LDH. L'intérêt était porté sur la qualité des plaquettes pendant la conservation. En dessous d'un pH de 6,1 les plaquettes sont endommagées de façon irréversible ; elles ont perdu leur fonctionnalité et leur viabilité. Si le pH est inférieur à 6,7 les plaquettes passent d'une morphologie discoïdale à une forme sphérique.

**DIETERLEN et coll. en 1995 (71')** en approchant les propriétés optiques d'une suspension plaquettaire par des mesures de transmission et de diffusion lumineuse, a proposé l'étude de la résistance osmotique plaquettaire. L'utilisation de l'appareil déjà développé pour les tests d'agrégation plaquettaire (4X rheoagregometer) lui a permis d'appliquer le test RCH afin d'évaluer le paramètre de changement de forme pour différents concentrés.

**FARRUGIA et coll. en 1995 (72)** a corrélé l'analyse de la taille des plaquettes avec les indicateurs de viabilité (pH et réponse au choc osmotique) lors de la conservation de concentrés plaquettaires pour la transfusion.

**MROWIEC et coll. en 1995 (73)** a utilisé le test RCH pour un suivi de la viabilité des plaquettes lors d'une conservation de concentrés à 22 °C pendant 5 jours.

**MASSE en 1995 (74)** a proposé parmi d'autres tests la réponse au choc hypotonique (RCH) pour un contrôle de qualité des produits plaquettaires.

**KOERNER et coll. en 1995 (75)**, par le test RCH et par le test d'agrégation, a montré que les fonctions plaquettaires sont mieux conservées en utilisant comme liquide de conservation des concentré du Plasmalyte-A.

**JUNG et coll. en 1996 (76)** a étudié le comportement quant à la taille et à la forme des plaquettes pendant leur conservation par le test RCH. Ce test est particulièrement utile dans le suivi et le contrôle de qualité des suspensions de plaquettes. En plus de la transmission, l'auteur a observé le signal de diffusion lumineuse.

### Conclusion :

Le test dit "Réponse au Choc Hypotonique" à 610 nm reste la technique la plus souvent utilisée pour étudier le comportement des plaquettes dans des situations transfusionnelles ou hématologiques :

- effet du glycérol lors de la cryopréservation (66,67) ;
- suivi de la viabilité (69,70,73) ;
- selon la nature de la conservation (65,75) ;
- critère de qualité des concentrés plaquettaires utilisés en transfusion (74,76) ;
- suivi de l'influence de fortes doses irradiation d'UltraViolet sur des concentrés plaquettaires (68) ;
- caractérisation de thrombopathies (41) ;
- ...
- de manière plus générale, pour tenter d'approcher les propriétés rhéologiques de la membrane.

Récemment, une étude multi-laboratoires a permis l'analyse *in vitro* des plaquettes par utilisation des tests : "Extent of shape change" et réponse au choc hypotonique (41'). La corrélation entre ces deux méthodes d'évaluation est correcte. Ces deux tests proposés montrent une précision, une reproductibilité et une sensibilité satisfaisantes.

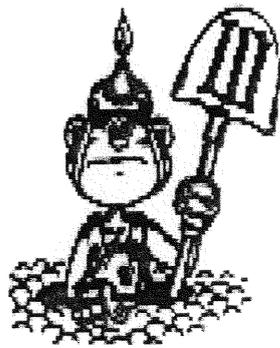
#### **4. PROBLEMATIQUE**

L'intérêt porté à la résistance osmotique des plaquettes est de plus en plus marqué par l'utilisation croissante du test RCH. En effet, quelle que soit la technique utilisée pour provoquer la contrainte osmotique et quelle que soit la méthode d'observation des phénomènes engendrés au niveau des plaquettes, l'analyse du comportement de ces cellules en hypotonie permet de "quantifier" leur viabilité. Cette dernière est le paramètre le plus important à contrôler avant toute transfusion de concentrés plaquettaires sur des malades, pour s'assurer d'une efficacité optimale.

Le test de la réponse osmotique des plaquettes peut également s'appliquer à d'autres études, principalement à l'incidence de molécules (médicaments, glycérol, ...) sur les caractéristiques de la membrane plaquettaire.

Mais actuellement le test RCH se limite à la mesure de la capacité de la plaquette à retrouver un volume normal après gonflement brutal dans un milieu hypotonique unique. De plus, les appareils utilisés (spectrophotomètres) ne sont pas adaptés à ces mesures et les paramètres doivent être calculés manuellement, ce qui est une source d'erreur importante.

La mise au point d'un test de résistance osmotique plaquettaire de routine est délicat. La plaquette restant une cellule difficile à étudier (transparente, petite en taille, d'activation facile,...).



*Adaptation  
du Fragilimètre  
à l'étude de la  
résistance osmotique  
des plaquettes*

## 1. INTRODUCTION

La modification de la morphologie de la plaquette sanguine est aisément réalisée par la variation de la pression osmotique à sa périphérie. Le gonflement cellulaire engendré, implique la recherche d'une méthode permettant de caractériser certains paramètres de cette cellule. Le suivi du comportement de la plaquette, par ses changements de forme géométrique en fonction de la pression osmotique, constitue l'un de ces paramètres.

Le *Fragilimètre* développé initialement pour le suivi de l'hémolyse des érythrocytes (**DIDELON ITBM**), en automatisant la technique manuelle dite de Dacie, permet après adaptation d'étudier la résistance osmotique des plaquettes. Le choix pour provoquer le choc osmotique s'est porté sur une dialyse lente afin de permettre une diffusion progressive des ions Na-Cl. Une membrane semi-perméable, utilisée comme enceinte de la solution étudiée, assure cette dialyse. La mesure en continu des variations de transmission lumineuse à travers la suspension est dépendante du changement de volume des cellules, et finalement de la lyse.

Une analyse des éléments et des lois physiques appliqués permettra de mieux introduire la description de la technique et du dispositif de mesure choisis pour le *Fragilimètre*.

La description de l'appareil et de son adaptation pour l'étude des plaquettes ouvrira sur des données techniques associées à de brèves explications. Un bref rappel de la mesure de l'hémolyse des hématies sera donné.

L'examen de la réponse du système, par une interprétation des mesures obtenues, permettra de définir les phénomènes physiologiques engendrés au niveau des plaquettes pendant l'augmentation progressive de la force ionique, et d'expliquer les raisons de la variation du signal lumineux recueilli.

La description de l'adaptation de l'appareil pour réaliser le test RCH sera également proposée. Avec le même dispositif optique de mesure, ce test peut en effet être proposé sur le *Fragilimètre*.

Enfin, en s'appuyant sur différents travaux publiés, une tentative d'explication des résultats en fonction de certains phénomènes physiologiques sera proposée.

## 2. GENERALITES

Le cœur du système, proposé dans le Fragilimètre, est basé sur deux phénomènes physiques :

- la pression osmotique ;
- la variation de transmission lumineuse.

Deux méthodes sont actuellement proposées pour créer cette différence de pression osmotique entre le milieu intra et extra-cellulaire. La plus utilisée est un choc osmotique par dilution immédiate d'une suspension de cellules avec de l'eau distillée, la seconde nécessite l'utilisation d'un système de dialyse. La solution pour réaliser cette diminution progressive de la concentration en ions Na-Cl dans la suspension réside dans l'utilisation d'une membrane semi-perméable (artificielle, en cellulose). Une brève description du comportement des membranes biologiques, des membranes semi-artificielles, et la définition de quelques équations seront proposées.

La solution retenue pour caractériser la résistance osmotique des cellules est basée sur les propriétés optiques des membranes cellulaires. Lorsqu'un faisceau lumineux traverse une suspension, la première loi d'optique appliquée pour interpréter la variation d'intensité recueillie est la loi de Beer-Lambert. Dans le cas de solution composée de cellules biologiques appelées à subir exclusivement des modifications de structures, les lois de diffusion deviennent prédominantes. Celles-là sont, pour cette étude, la base de la variation de l'extinction du faisceau lumineux.

### **2.1. La pression osmotique (78,79)**

Toutes les molécules d'une substance, qu'elle soit sous forme solide, liquide ou gazeuse, sont dans un état continu de mouvement ou de vibration. Plus la substance est chaude, plus le mouvement de ses molécules est rapide. (à la température corporelle, une molécule d'eau se déplace à une vitesse d'environ 2500km/h). Le mouvement thermique dans un liquide ou un gaz distribuera les molécules au hasard de façon uniforme dans tout le récipient. Ainsi, si à l'origine un soluté est plus concentré dans une région de la solution, le mouvement thermique répartira le soluté des régions de forte concentration vers les régions de faible concentration jusqu'à ce que le soluté atteigne une concentration uniforme dans la solution.

A pression et température constantes, le sens du transport d'un constituant (eau ou soluté non chargé) est dicté par la valeur de son potentiel chimique. Le transport net d'eau d'un compartiment à un autre s'accompagne d'une variation de volume et donc de pression. Les principaux éléments impliqués ou responsables de la variation de pression osmotique engendrée au niveau des cellules, pour le dispositif de mesure du Fragilimètre, sont :

- la membrane plasmique des plaquettes ;
- la membrane semi-perméable (enceinte de la suspension étudiée) ;
- les volumes de la cuve de mesure et du porte échantillon ;
- la température.

### **2.1.1. La membrane biologique (80)**

La membrane plasmique constitue l'élément structural majeur des cellules, elle régit le passage des substances entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Cette perméabilité est sélective, elle varie pour certaines substances.

Les molécules traversent les membranes cellulaires grâce à différents mouvements :

- **La diffusion** correspond au déplacement des molécules d'un emplacement à l'autre selon le mouvement thermique "au hasard". Le flux net d'une substance, qui diffuse entre deux compartiments, s'effectue toujours de la zone à forte concentration vers la zone de concentration plus faible. L'équilibre de diffusion est atteint quand les concentrations dans les deux compartiments sont égales. Il en résulte un flux net nul. Les ions minéraux diffusent à travers les membranes en passant par des canaux ioniques formés par des protéines membranaires intrinsèques. La diffusion nette des ions à travers une membrane dépend du gradient de concentration et du potentiel de la membrane.
- **Les systèmes de transport avec intermédiaire** nécessitent la liaison du soluté à un transporteur protéique dans la membrane. Les changements de conformation que subit le transporteur font déplacer le site de liaison du côté opposé de la membrane où le soluté se dissocie du transporteur protéique.
- **L'endocytose et l'exocytose**. Au cours de l'endocytose, des régions de la membrane plasmique s'invaginent et se ferment sur elles-mêmes pour former des vésicules qui contiennent un petit volume de matériel extra-cellulaire. L'exocytose, qui se produit quand les vésicules intracellulaires fusionnent avec la membrane plasmique, offre aux molécules

qui ne peuvent diffuser à travers les membranes, comme les protéines, une voie de libération dans l'espace extra-cellulaire.

- **L'osmose.** L'osmose est la diffusion de l'eau d'une zone riche en eau (pauvre en soluté) vers une zone pauvre en eau (riche en soluté). L'osmolarité est la concentration totale des solutés en solution, elle détermine la concentration en eau. Plus l'osmolarité d'une solution est élevée, plus la concentration en eau est faible. L'osmose est le phénomène essentiel concerné dans cette étude.

L'osmose, à travers une membrane perméable à l'eau mais imperméable au soluté, entraîne une augmentation de volume dans le compartiment ayant à l'origine l'osmolarité la plus élevée et une diminution de volume dans le compartiment ayant l'osmolarité la plus faible. Plus l'osmolarité d'une solution est grande, plus la pression osmotique est élevée.

L'osmolarité du liquide extra-cellulaire est égale à environ 0,31 Osmol/L. Comme l'eau est en équilibre de diffusion de part et d'autre de la membrane, le liquide intra-cellulaire a aussi une osmolarité de 0,31 Osmol/L. Les principaux solutés non diffusibles du liquide extra-cellulaire sont les ions Sodium ( $\text{Na}^+$ ) et chlorure ( $\text{Cl}^-$ ), alors que les principaux solutés non diffusibles du liquide intracellulaire sont les ions potassium ( $\text{K}^+$ ) et les solutés organiques.

Le tableau VI présente les termes utilisés pour décrire l'osmolarité des solutions contenant diverses compositions de solutés diffusibles et non diffusibles.

Des changements de l'osmolarité extra-cellulaire peuvent entraîner une diminution de volume ou un gonflement des cellules en raison des modifications produites dans la concentration extra-cellulaire en eau (fig 14). Ainsi, les cellules placées dans des solutions hypotoniques gonflent, alors que les cellules placées dans des solutions hypertoniques diminuent de volume.

**Remarque :** une solution isotonique de chlorure de sodium (9 g/L de NaCl) correspond à une solution saline isotonique de 0,155 M (Molaire) ou de 0,310 Osmol/L. Le chlorure de sodium est formé d'électrolytes complètement dissociés (soit à 1 mole de soluté correspond 2 Osmoles). Les valeurs de correspondance entre les expressions de la force ionique en M ou en g/l pour le NaCl sont données ci-après : (dans la plage la plus utilisée)

[NaCl] g/l	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Force ionique M	0,017	0,034	0,051	0,069	0,086	0,103	0,120	0,137	0,155

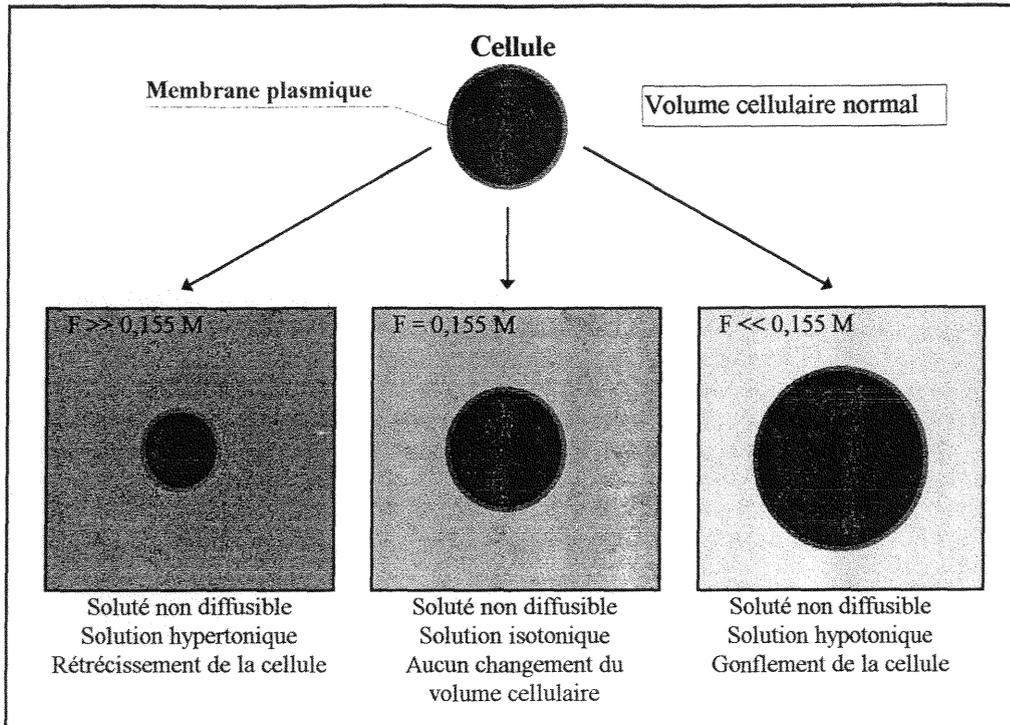


Figure 14 : variation du volume cellulaire produite par des solutions hypertonique, isotonique et hypotonique.

Tableau VI : termes concernant l'osmolarité des solutés et la tonicité des solutions.

Termes	définition
Iso-osmotique	Solution qui contient 0,31 Osmol/L de solutés, qu'ils soient diffusibles ou non diffusibles dans les membranes
Hyperosmotique	Solution qui contient plus de 0,31 Osmol/L de solutés, qu'ils soient diffusibles ou non diffusibles dans les membranes
Hyposmotique	Solution qui contient moins de 0,31 Osmol/L de solutés, qu'ils soient diffusibles ou non diffusibles dans les membranes
isotonique	Solution qui contient 0,31 Osmol/L de solutés non diffusibles, quelle que soit la concentration des solutés diffusibles dans les membranes
hypertonique	Solution qui contient plus de 0,31 Osmol/L de solutés non diffusibles, quelle que soit la concentration des solutés diffusibles dans les membranes
hypotonique	Solution qui contient moins de 0,31 Osmol/L de solutés non diffusibles, quelle que soit la concentration des solutés diffusibles dans les membranes

Dans le principe de mesure (Fragilimètre), la grandeur retenue pour exprimer la notion de pression osmotique sera la force ionique déduite de la concentration en ion sodium et chlorure (Na-Cl). Ainsi, à des solutions isotoniques correspondra une force ionique de 0,155 M.

### **2.1.2. La membrane semi-perméable**

Les phénomènes mis en jeu au niveau de la membrane synthétique sont infiniment plus simples que le processus de transport actif faisant intervenir des réactions chimiques complexes à l'origine de la remarquable spécificité des enveloppes cellulaires. La membrane synthétique a un comportement proche de la membrane tissulaire, d'où son nom de membrane artificielle.

Les membranes semi-perméables effectuent, par définition, la sélection de molécules d'après des critères de taille et de forme. A travers ce type de membrane le solvant peut circuler librement mais pas le soluté. Un phénomène prend alors naissance : l'osmose (siège de nombreux processus biologiques).

Remarque : le diamètre des pores définit la sélectivité (filtration) et le débit. Cette notion est caractérisée par le seuil de coupure défini en Daltons : Da, représentatif de la masse atomique au coefficient N près avec  $N = N_b \text{ d'Avogadro } (6.02 \cdot 10^{23})$ .

Pour optimiser le dispositif de mesure, le choix s'est porté sur des membranes en matières plastiques par leurs propriétés mécaniques (déformation, élasticité) et biochimiques (seuil de coupure, neutralité électrique).

Caractéristiques principales de la membrane choisie:

- membrane semi-perméable en cellulose, marque Spectra/Por ;
- seuil de coupure 10 000 Da ;
- circonférence de 20 mm.

Etant donné ce seuil de coupure, cette membrane autorisera le passage du soluté (ions Na-Cl) et permettra l'échange d'eau d'un compartiment à l'autre (la molécule d'eau peut être assimilée au transporteur des ions Na-Cl). Les échanges sont également favorisés par le mouvement Brownien des particules qui maintient l'homogénéisation des solutions. Mais cette membrane reste une barrière efficace contre les molécules dont la taille est supérieure aux diamètres des pores (cellules du sang, protéines, certains constituants). Ainsi, en assurant l'emprisonnement des particules étudiées, elle est utilisée comme enceinte des suspensions, au niveau du porte échantillon.

De plus, la quasi transparence de la membrane choisie autorise l'utilisation d'une technique optique. L'atténuation de l'intensité lumineuse à travers la membrane est d'une part constante et d'autre part relativement faible.

### **2.1.3. Température, volume des compartiments** (81)

Pour deux solutions séparées par une membrane semi-perméable, la vitesse de diffusion des ions Na-Cl vers la solution de concentration ionique la plus faible, dépend essentiellement de la dimension des pores de la membrane synthétique, de la température, et des différents volumes.

De plus, la pression osmotique est définie par :

$$\Pi = R.T. (C_1 - C_2) \quad (\text{loi de Van t' Hoff})$$

avec R : constante des gaz parfaits ( $8.32 \text{ JK}^{-1}$ )

T : **température** exprimée en degrés Kelvin

( $C_1 - C_2$ ) : différence de concentration en soluté des deux solutions.

Les concentrations en soluté sont fonction du nombre de mole par **volume**.

### **2.1.4. Application au Fragilimètre**

Pour obtenir d'une diminution progressive de la concentration en ions NaCl (augmentation de la différence entre la force ionique intra et extra-cellulaire) au niveau de la suspension étudiée, un porte échantillon à été spécialement créé. Pour préciser les différents mouvements ou flux d'eau et de soluté agissant pendant la mesure, un schéma simplifié est proposé (fig 15). Cette représentation permettra également de suivre la variation des pressions osmotiques, donc des forces ioniques exercées.

*Description des conditions initiales :*

- ⇒ la cuve de mesure est remplie de 90 mL d'eau distillée (force ionique nulle) ;
- ⇒ le porte échantillon contient une solution de force ionique égale à 0,155 M ;
- ⇒ la membrane semi-perméable n'autorise que le passage des ions NaCl et des molécules d'eau ;
- ⇒ La membrane plasmique est perméable uniquement à l'eau.

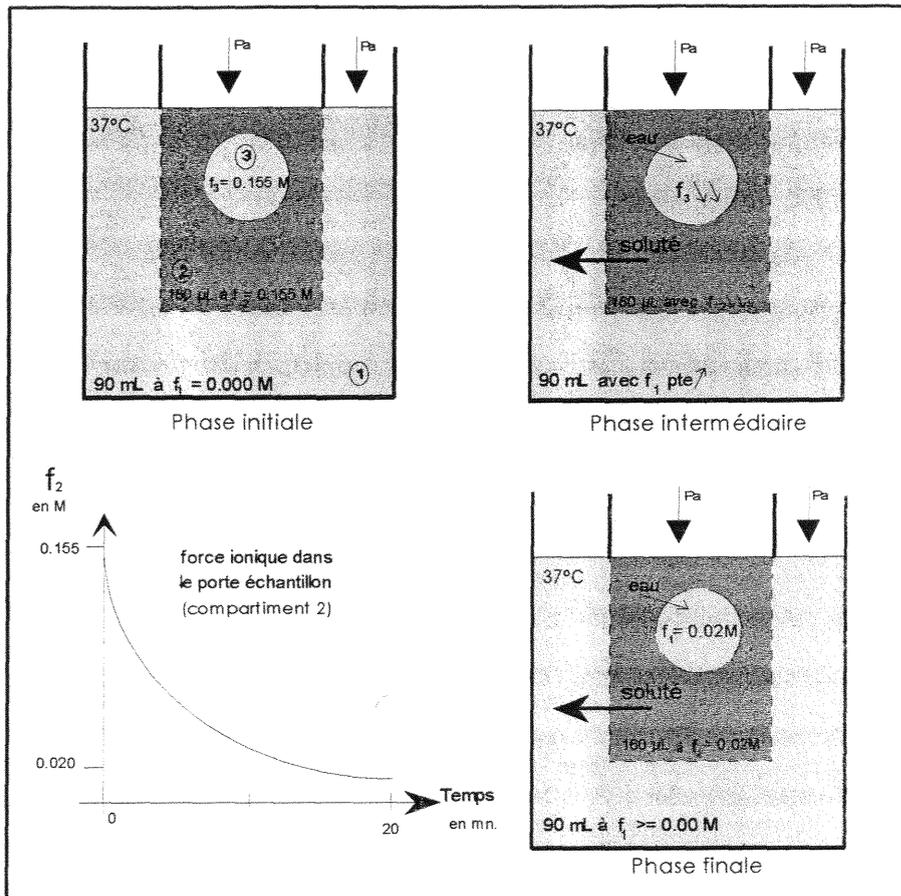


Figure 15 : représentation schématique des différentes étapes correspondant aux variations de pression osmotique engendrées dans le dispositif de mesure du Fragilimètre.

Le compartiment 1 correspond au volume de 90 mL dans la cuve (bêcher). Le compartiment 2 est représentatif du milieu de suspension des plaquettes (plasma). Le compartiment 3 correspond au liquide cytoplasmique (intra-cellulaire). (f: force ionique)

A l'instant  $T=0$  correspondant à l'étape initiale, le compartiment 1 est à une force ionique nulle tandis que les compartiments 2 et 3 sont en isotonicité (0,155 M). Cette différence de concentration en ions Na-Cl entre les volumes 1 et 2 va conduire à un retour à l'équilibre en forçant les échanges d'eau et de solutés sous l'impulsion de la pression osmotique. Durant toutes les étapes, la pression extérieure s'appliquant à l'interface eau ou solution et air correspond à la pression atmosphérique ( $P_a = 760$  mm de mercure).

Au stade intermédiaire, le compartiment 2 voit sa force ionique diminuer en fonction du temps (passage du soluté vers le compartiment 1). Au niveau de l'échantillon (2 et 3), la baisse progressive de la force ionique extra-cellulaire va provoquer uniquement l'influx d'eau dans le compartiment 3 (répondant aux caractéristiques des membranes biologiques). Ainsi l'augmentation du volume 3, par dilution du contenu intra-cellulaire avec l'eau, va permettre la diminution de la force ionique intracellulaire, et donc conduire également à un équilibre des forces ioniques.

En finalité, après 20 minutes, le compartiment 2 est à une force ionique de 0,02 M. Et tout concourt à forcer un équilibre entre les trois compartiments (entre 1 et 2, et entre 2 et 3). C'est ce qui explique les modifications morphologiques des cellules (3) devant compenser la diminution de la force ionique dans le compartiment 2. La courbe illustrée sur la figure 11 montre la décroissance de la force ionique en fonction du temps dans le compartiment 2. Cette variation est de forme exponentielle, soit une chute rapide de la force ionique dans les premiers instants, pour s'approcher d'une asymptote (parallèle à l'axe des abscisses). Quel que soit le temps, la valeur de la force ionique dans le compartiment 2 ne sera jamais nulle.

### **2.1.5. Etat des lieux**

La force qui s'oppose au flux de l'eau à travers une membrane séparant une solution contenant des solutés non diffusibles et de l'eau pure est appelée pression osmotique. Plus l'osmolarité d'une solution est grande, plus sa pression osmotique est importante. La pression osmotique reste une mesure indirecte de la concentration en eau.

Le dispositif utilisé peut se décomposer en deux phases concomitantes. La première concerne l'échange de soluté (ions Na-Cl) du porte échantillon vers la cuve d'eau distillée (interface : membrane semi-perméable). Elle permet la diminution de la force ionique dans la suspension (passage de 0,155 M à 0,02 M en 20 minutes). La seconde correspond à l'influx d'eau à l'intérieur des plaquettes pour compenser la différence de force ionique entre le milieu intra et extra-cellulaire (interface : membrane plasmique). Ce gonflement osmotique génère une augmentation du volume de la cellule étudiée. Ces différentes pressions osmotiques exercées obéissent aux lois d'équilibre des concentrations du soluté.

Dans le dispositif proposé, la décroissance progressive de la force ionique générée par la diffusion des ions Na-Cl (soluté) est obtenue par l'utilisation d'une membrane semi-perméable. Cette décroissance est fonction des caractéristiques de cette membrane, des volumes impliqués et de la température.

## **2.2. Diffusion lumineuse**

La forme, la taille, l'orientation, l'indice de réfraction, la structure interne et les interactions sont des paramètres déterminant les propriétés de diffusion de la lumière par des particules. Aussi n'est-il pas étonnant que cette technique soit largement utilisée pour étudier toutes sortes de

diffuseurs, biologiques ou non, d'autant plus que la méthode est rapide, non destructrice et très sensible.

L'interprétation, du phénomène de diffusion, sera appliquée à des suspensions de plaquettes dans le but d'étudier leur gonflement, leur résistance osmotique, voire leur résistance à la lyse.

### **2.2.1. Introduction**

La principale caractéristique utilisée pour étudier des solutions en colorimétrie et en photométrie est basée sur les lois de Beer-Lambert, qui mettent en équation les propriétés d'absorption (relation entre l'intensité de la lumière incidente et de la lumière transmise par un milieu absorbant). Ainsi, les mesures classiques pratiquées sur des spectrophotomètres permettent de définir des pourcentages d'absorption ou de transmission de solutions à une longueur d'onde donnée.

Equation d'absorption de Beer-Lambert :  $A = \log_{10} (I_0/I) = \epsilon \cdot C \cdot l$

avec :  $I_0$  : intensité de lumière incidente et  $I$  : intensité de lumière transmise,  
 $\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire décimal en  $\text{cm}^2/\text{g}$ ,  
 $C$  : concentration de l'élément absorbant en  $\text{g}/\text{cm}^3$ ,  
 $l$  : longueur du trajet optique en cm

Cette loi peut être très utile pour apprécier la concentration cellulaire de la suspension étudiée, à un instant donné où les cellules sont stables du point de vue de leur structure, de leur composition et de leur forme. Mais pour l'étude envisagée, qui porte sur le suivi de modifications morphologiques de cellules biologiques sous l'effet d'une pression osmotique croissante, les variations de lumière mesurées ne dépendent pas du simple phénomène d'absorption, mais font appel à la diffusion.

La technique de diffusion de la lumière a été employée pour l'étude des macromolécules (82) et plus précisément pour certaines protéines (83,84). De telles études peuvent fournir des renseignements quant à la masse moléculaire des produits et leur forme (sphère, bâtonnet, chaîne). Ce principe a ensuite été appliqué à l'étude des cellules biologiques, la plaquette par exemple (85).

### **2.2.2. Théorie de la diffusion**

La diffusion lumineuse sur des particules est complexe à analyser. Ces propriétés sont fonction principalement de la taille des particules étudiées et de la longueur d'onde du faisceau

lumineux excitateur. De nombreux auteurs ont tentés d'approcher ce phénomène lumineux en proposant des équations très théoriques, qui s'appliquent généralement à des billes de latex dont la taille est bien définie. Dans le souci d'éviter une énumération de formules plus compliquées les unes que les autres, un bref descriptif des conditions de l'application de la diffusion aux cellules sanguines et plus précisément à la plaquette est proposé. Cette étude s'appuie sur les travaux de Latimer (86,87,88,89), Frojmovic (90), Holme (91) pour ne citer que ces derniers, qui se sont intéressés aux délicats problèmes de l'extinction d'un faisceau lumineux à travers une suspension de plaquettes appelées à évoluer (phénomène physiologique de l'activation : changement de forme, agrégation, ...). Une approche plus théorique et plus générale (mathématique), qui ne fait pas l'objet de ce document, a été proposée par quelques auteurs (91').

Il existe deux grands types de théories sur la diffusion de la lumière :

- Les théories concernant la diffusion par une particule unique, qui considèrent l'intensité lumineuse diffusée par la solution comme étant la somme des intensités diffusées par chaque particule. Elles s'appliquent à des solutions très diluées, et ont été développées par Rayleigh (92), Gans (93), et Mie (94) dans le cas de particules sphériques.
- Les théories qui attribuent la diffusion à des fluctuations de concentration au sein de la solution, principalement développées par Einstein et plus récemment par Debye (95).

D'un point de vue théorique, la taille de la particule diffusante est très importante. En effet, si ses dimensions sont très petites devant la longueur d'onde de la lumière incidente, elle peut être considérée comme une source lumineuse unique. Par contre, lorsque ses dimensions sont comparables à la longueur d'onde, les ondes diffusées par les différents points de la particule créent des phénomènes d'interférences, dont il faut tenir compte dans les calculs.

Diffusion de la lumière à travers une particule biologique dont la taille est supérieure à la longueur d'onde ( $\lambda$ ) du faisceau incident :

La diffusion par des sphères de taille et d'indice de réfraction quelconques est prédite par les relations de Mie. Pour des particules de tailles supérieures à  $\lambda$ , la simple expression de la diffraction anormale de Van de Hulst (96) peut être utilisée.

Les principes de l'optique géométrique et de la diffraction, basés sur les relations de Van de Hulst, suggèrent pour des particules transparentes un comportement identique à celui de minuscules dioptrés sphériques. La figure 16 illustre ces phénomènes de diffusion.

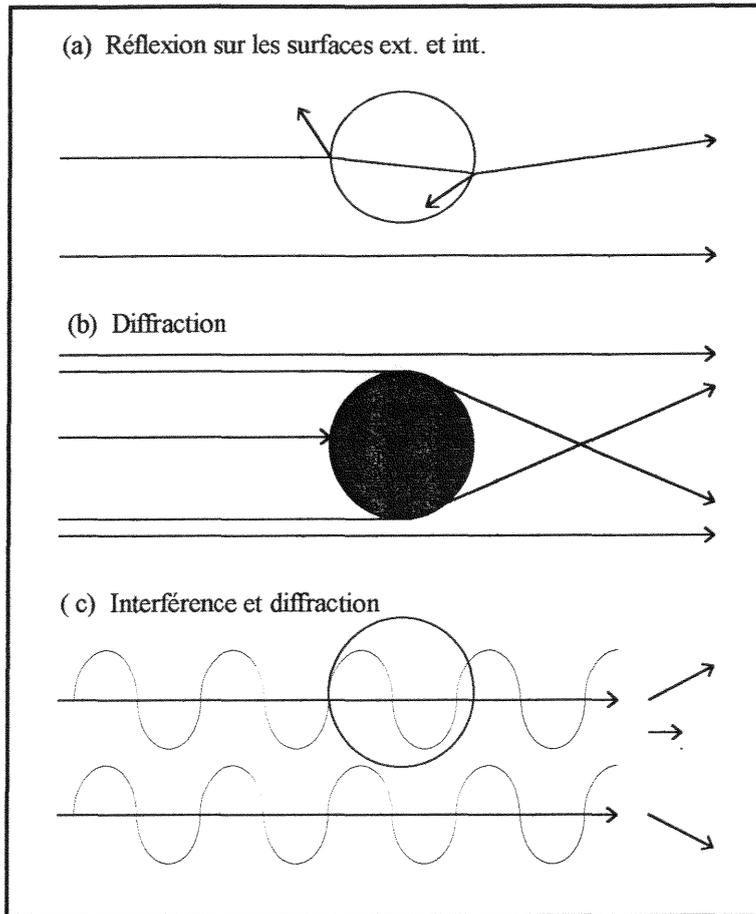


Figure 16 : mécanismes de diffusion sur une particule dont la taille est supérieure à  $\lambda$ , et dont la valeur de l'indice de réfraction est proche de celle du centre.

- (a) représentation de la diffusion induite par la réflexion du faisceau incident sur la membrane externe et interne de la particule. Cette réflexion sur les "bords" de la cellule est le type principal reconnu de diffusion. Il est estimé que 5 à 30 % de l'intensité lumineuse incidente frappant une particule biologique en solution dans l'eau est diffusée par ce mécanisme.
- (b) représentation de la diffraction par une sphère opaque, prédite par le principe de Huygens. La particule dévie deux fois plus de lumière provenant d'un faisceau collimaté qui frappe sa section transversale (paradoxe de l'extinction). Pour une particule qui absorbe toute la lumière reçue, le coefficient d'absorption  $K_{\text{abs}}$  est égal à 1.0. Si elle diffuse une quantité équivalente de lumière autour d'elle par diffraction, le coefficient de diffusion  $K_{\text{diff}}$  est égal à 1.0. Ainsi le coefficient d'extinction  $K_{\text{ext}}$  est égal à 2.0 ( $K_{\text{ext}} = K_{\text{abs}} + K_{\text{diff}}$ ).
- (c) Si la particule transmet une partie de la lumière qui la frappe, l'onde transmise interfère avec la lumière passée à l'extérieur (autour de la particule). Cette condition est

réalisable pour  $K_{ext} > 3.0$ . Pour une conservation d'énergie, les interférences destructives dans la direction "avant" conduisent à des interférences constructives dans d'autres directions. Par définition, cette énergie impliquée dans les interférences constructives pour les autres directions correspond à la diffusion lumineuse.

Les équations de Mie et de Van de Hulst pour des sphères homogènes isotropiques prédisent la diffusion par les mécanismes de la figure (b) et (c). Les relations de Mie expliquent la réflexion sur les surfaces de la figure (a).

résumé : la diffusion de la lumière par des particules, dont la taille est supérieure à celle de la longueur d'onde du faisceau incident (collimaté), correspond aux phénomènes suivants :

- ⇒ la réflexion sur la surface des particules;
- ⇒ la réfraction à travers leur volume;
- ⇒ la diffraction par les bords de la particule.

La figure 17 permet de caractériser les trois types de transmission rencontrés pour une étude de diffusion d'un faisceau lumineux collimaté à travers une suspension de cellules ( $\text{taille} > \lambda_i$ ).

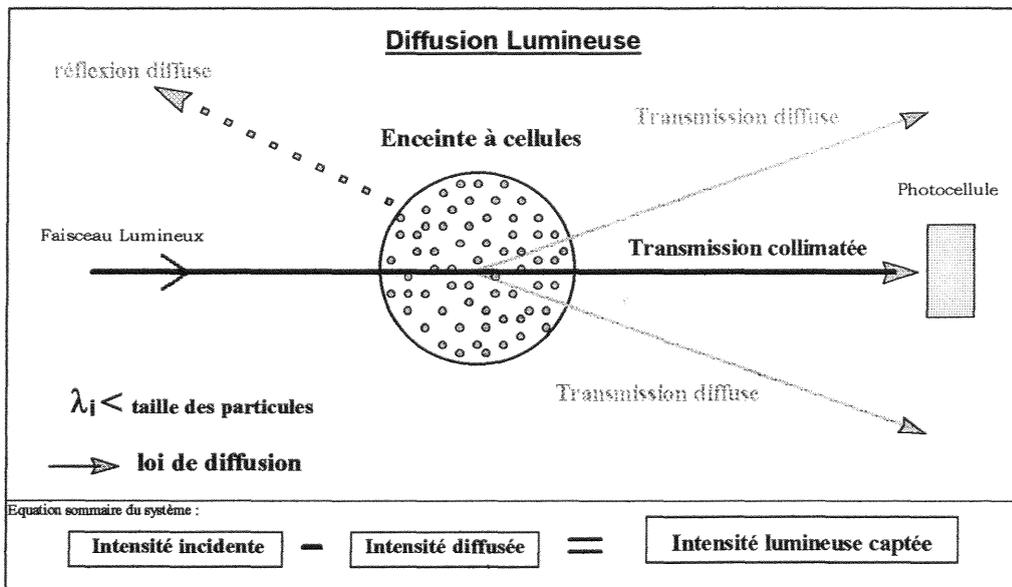
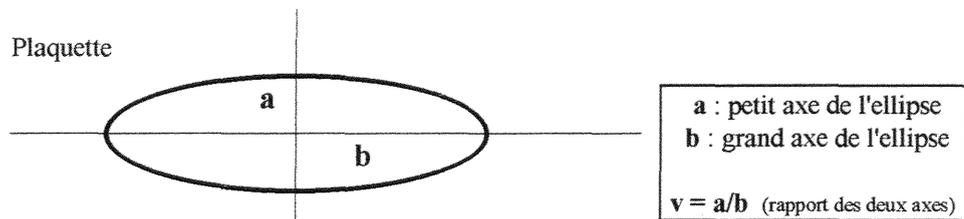


Figure 17 : représentation des trois transmissions caractéristiques de la diffusion pour un faisceau lumineux illuminant une suspension de particules de taille  $> \lambda_i$ .

### 2.2.3. Diffusion sur des plaquettes

La variation de transmission de lumière à travers une suspension de plaquettes est souvent proposée pour étudier ses changements de forme et de volume, et principalement son agrégation. Différents auteurs ont tenté, par une approche théorique, de prédire numériquement ces variations d'intensité de transmission. Les propriétés optiques sont calculées par un développement mathématique basé sur une combinaison de l'approximation de la diffraction anormale avec les équations de Lorentz-Mie. Des études sur d'autres cellules biologiques avaient révélé que les propriétés de diffusion pouvaient être évaluées avec les équations conventionnelles de diffusion (87).

La plaquette est une cellule qui, dans son état normal (non activée), se présente sous la forme discoïdale, modélisable par une ellipsoïde de révolution.



Equation de l'ellipsoïde de révolution :

$$\left[ \frac{x}{(a \cdot v)} \right]^2 + \left( \frac{y}{a} \right)^2 + \left( \frac{z}{a} \right)^2 = 1$$

son volume est donné par :

$$V = \left( \frac{4}{3} \right) \cdot \pi \cdot b^3 \cdot v$$

remarque : généralement, le rapport  $v$  est égal à 0,3 pour une forme discoïdale et à 1 quand les plaquettes sont sphériques. L'indice  $v$  peut permettre de définir la forme des plaquettes. La plaquette ne présente pas le même profil géométrique suivant le plan d'observation. En effet, si elle est ellipsoïdale dans le plan transversal, elle sera cylindrique dans le plan longitudinal. Cela conduit dans le cas d'une suspension de plaquettes, à suivre un profil moyen de ces cellules. Ainsi, le grand axe prendra la valeur  $[2 \cdot a]$  et le petit axe celle de  $[2 \cdot a \cdot u]$  où  $u$  dépend de l'orientation avec  $v \leq u \leq 1$ .

L'extinction optique pour une suspension de particules de même taille est donnée par :  
(d'après diffraction anormale de Van de Hulst en considérant des sphères équivalentes)

$$E_{\gamma}^{\lambda} = \log (\text{transmittance}^{-1}) = 0.434 \cdot L \cdot N \cdot A \cdot K_{\gamma}^{\lambda}$$

- où  $\lambda$  : longueur d'onde du faisceau incident  
 $\gamma$  : ouverture numérique du système de mesure (capteur lumineux)  
 $L$  : épaisseur de l'échantillon traversé (cm)  
 $N$  : concentration cellulaire dans l'échantillon (nombre de particule/mL)  
 $A$  : moyenne des aires de projection pour toutes les orientations d'une cellule unique présente dans le faisceau (cm<sup>2</sup>)  
 $K$  : moyenne du rendement optique d'une cellule (ou coefficient d'atténuation), avec  $K_{\gamma}^{\lambda} = K_{\text{abs}} + K_{\text{diff}}$

Remarque : si la suspension est composée de particules de  $j$  tailles différentes, l'équation correspondra à la somme des  $j$  termes pour chaque catégorie de taille ( chaque terme possédant son propre  $K$ ,  $A$ ,  $N$ ).

Pour des cellules non-absorbantes, il est à noter que  $K_{\gamma}^{\lambda} = K_{\text{diff}}$ , avec  $K_{\text{diff}}$  fonction essentiellement de  $v$ ,  $n$  (indice de réfraction) et de  $\lambda$ .

Le produit  $A.K$  est assimilé à la section efficace d'extinction pour une cellule.

Pour des modifications de volume, l'indice de réfraction  $n$  de la cellule peut être défini par :

$$n = 1 + (n_0 - 1) \cdot V_0 / V$$

avec  $n_0$  et  $V_0$  pour les valeurs normales

{ Quelques données numériques, exemple pour une plaquette normale :  $a = 0,6 \mu\text{m}$ ,  $b = 2 \mu\text{m}$ ,  $V = 7 \mu\text{m}^3$ ,  $n = 1,044$  suivant le dispositif de mesure du Fragilimètre :  $L = 1 \text{ mm}$ ,  $N = 300\,000$  plaquettes/mL }

Les travaux de Latimer et al. en 1968 (86) ont approfondi les calculs théoriques pour étudier les variations de la diffusion et de l'absorption causées par des modifications de conformation des particules. Les résultats s'appliquent sur des changements de volume tout en conservant leur poids sec ou sur des changements de la structure interne.

### Effet du changement de volume

Les calculs théoriques effectués permettent, suivant la longueur d'onde d'excitation choisie, d'observer l'influence du changement de volume sur la valeur du coefficient d'extinction  $E$ . La figure 14 illustre ces notions pour différentes particules biologiques.

Les plaquettes se situent dans la catégorie (d) des fragments de chloroplaste ( $V_0 = 8 \mu\text{m}^3$ ). Pour une longueur d'onde d'excitation supérieure à 600 nm, le coefficient d'extinction diminue avec l'augmentation de volume des particules. Ces résultats sont confirmés par la figure 19.

Un indice noté  $\psi$  correspondant à la pente des courbes obtenues sur la figure 18 ( $\Delta E / \Delta V$ ), peut être calculé à partir du paramètre de taille  $x$  d'une particule (pour des sphères, d'après Van de Hulst).

$$x = 4 \cdot \pi \cdot a \cdot (n-1) \lambda$$

avec  $a$  : rayon de la sphère

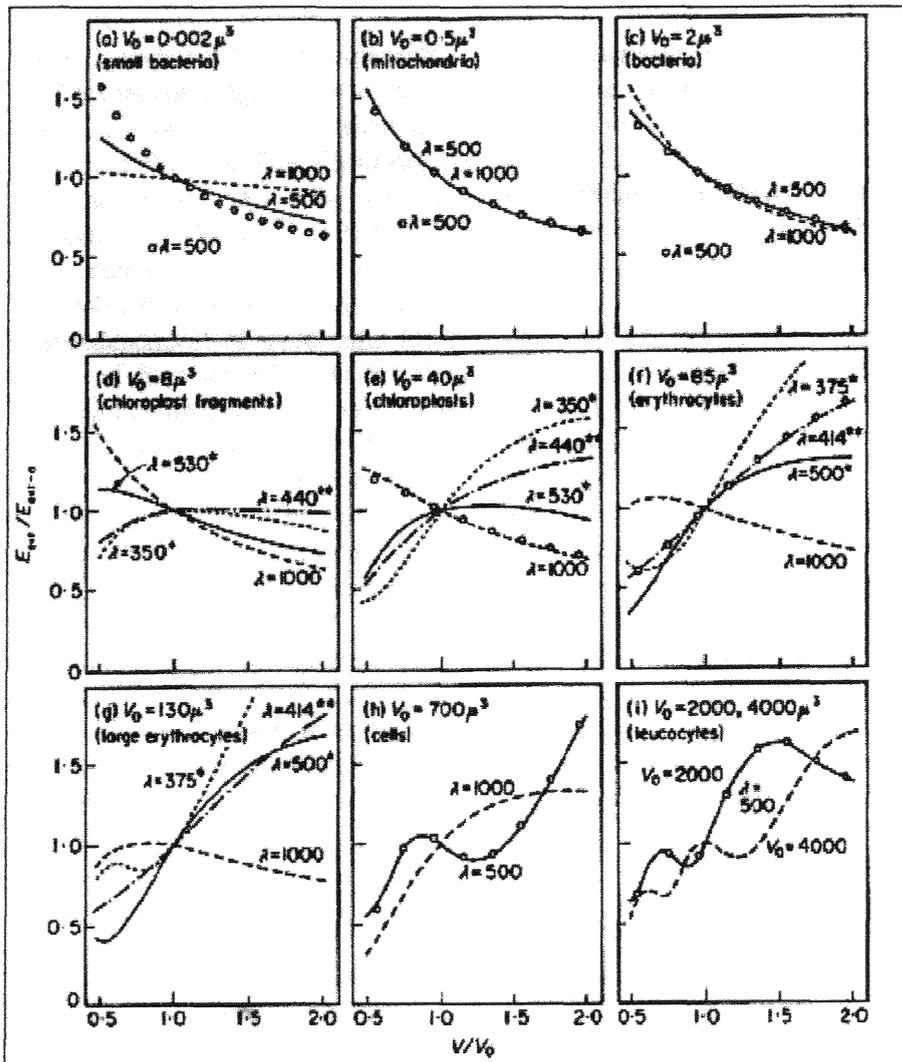


Figure 18 : normalisation de l'extinction de suspension pour des particules non absorbantes dont le volume change, mais pas leur poids sec, d'après Latimer (86) (courbes correspondant aux valeurs de E l'extinction en fonction du changement de volume  $V/V_0$ )

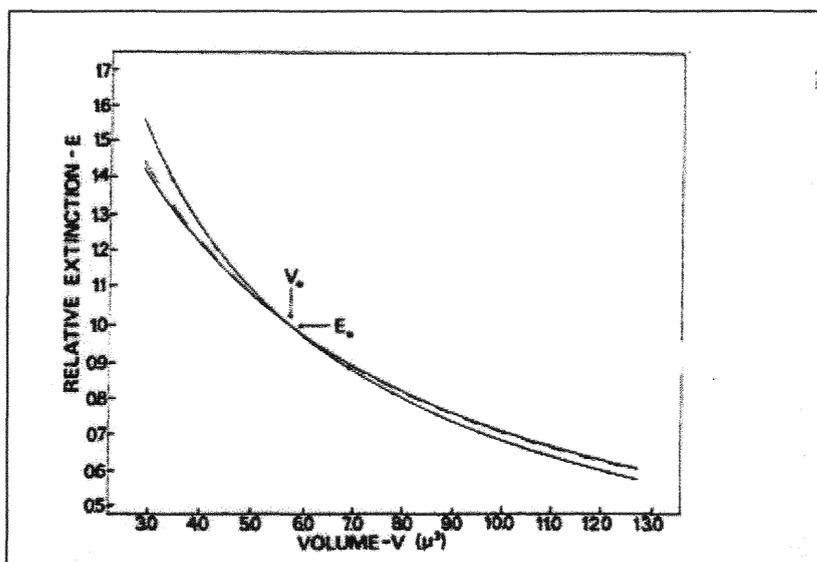


Figure 19 : prédiction relative de l'extinction lumineuse en fonction du volume des plaquettes, d'après Latimer (88).  $V_0$  et  $E_0$  (valeurs normales).

#### Effet du changement de structure interne :

Ces modifications peuvent être engendrées, dans le cas de la plaquette, par des changements de forme (fusion des membranes), par un influx d'eau dans la cellule, par une sécrétion de substances, ... . Elles conduisent toutes à une variation de l'indice de réfraction moyen intracellulaire. La diffusion lumineuse interne sera donc influencée. Le changement d'indice est un facteur important dans la détermination de l'extinction d'un faisceau lumineux par une particule.

Remarque : une modification de la structure interne d'une particule peut ressembler à une modification de volume, en considérant une redistribution dans l'espace des constituants.

Théoriquement, l'influence de trois facteurs :  $n$  (indice de réfraction),  $a$  (rayon, paramètre de forme et de volume) et  $\lambda$  (longueur d'onde du faisceau lumineux incident), semble donc déterminante dans la variation d'un signal de transmission lumineuse frappant une suspension de cellules.

#### **2.2.4. Discussion**

Pour une étude de transmission de lumière à travers une suspension de cellules, il est impératif de bien définir les éléments mis en œuvre. Ces derniers seront prépondérants dans l'application des lois optiques et plus précisément de la diffusion lumineuse impliquée (réflexion diffuse, diffraction, ...). Dans cette étude, où le but est de suivre les modifications morphologiques (forme, volume) des plaquettes, la quantification de la diffusion, par la mesure des variations de transmission directe, semble être la technique adaptée.

Pour que les lois de la diffusion (décrites précédemment) soient applicables et que les résultats expérimentaux coïncident avec les attentes théoriques, tout en considérant certaines conditions initiales imposées par le choix des cellules à étudier, des choix matériels s'imposent.

En premier lieu, le faisceau excitateur doit être issu d'une source lumineuse collimatée, monochromatique et d'une longueur d'onde suffisamment importante pour rendre les plaquettes faiblement absorbantes, tout en restant inférieure (au moins d'un rapport 2) à la taille des cellules. De plus, pour améliorer l'interprétation des mesures, l'intensité lumineuse de cette source doit être constante dans le temps (stabilité correcte).

L'autre instrument optique essentiel est le capteur photosensible. Sa surface d'analyse et son ouverture numérique doivent permettre de mesurer efficacement les variations de la

transmission collimatée, inverse de la variation de diffusion sur les cellules (la transmission collimatée est égale à l'intensité incidente moins l'intensité diffusée dans le cas particulier de cette étude).

Pour le dispositif de mesure du Fragilimètre, le choix s'est porté sur une diode laser collimatée de 3 mW (une lame semi-transparente placée sur le trajet optique avant la cuve de mesure, par une réflexion à 90°, permet d'atténuer de 90% l'intensité du faisceau incident) et de longueur d'onde  $\lambda$  égale à 780 nm. Un contrôle de la faible absorbance à  $\lambda$  d'un PRP a été réalisé sur un spectrophotomètre (type Beckmann). Le spectre obtenu (fig 20) permet de vérifier que les mesures vont s'affranchir des problèmes d'absorption de certains constituants, principalement des protéines. Ainsi, le signal lumineux recueilli sur la cellule photoélectrique sera représentatif du phénomène de diffusion lié aux modifications de forme et de volume des cellules.

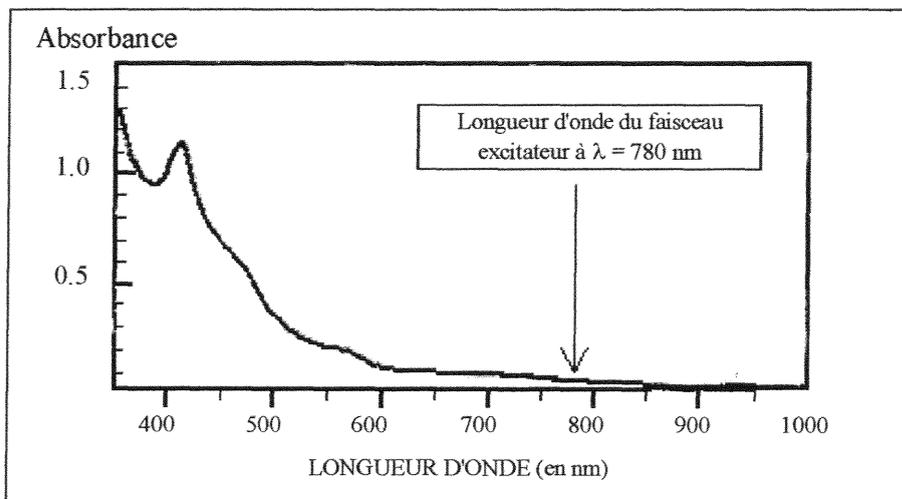


Figure 20 : spectre d'absorption d'un plasma riche en plaquettes (l'eau distillée a été utilisée comme référence : blanc), obtenu sur un spectrophotomètre Beckmann.

De plus, compte tenu :

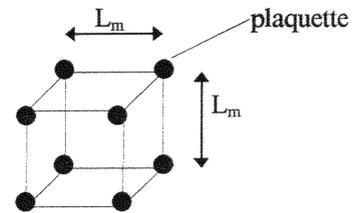
- de l'importance de la distance moyenne :  $L_m$  séparant deux plaquettes dans l'échantillon, qui doit être grande devant  $\lambda$  (en considérant que  $L_m \geq 5 \lambda$ , avec  $\lambda = 780 \text{ nm}$ , la distance  $L_m$  est voisine de 2 fois la taille moyenne des plaquettes, soit  $4 \mu\text{m}$ ) afin de considérer pour un modèle multicouches des centres diffuseurs distincts,
- de la taille moyenne des plaquettes :  $b = 2 \mu\text{m}$  (fonction de leur orientation),
- de l'épaisseur de l'échantillon traversé par le faisceau,  $L = 1 \text{ mm}$ ,

- de la forme elliptique et de la taille du faisceau lumineux (petit axe = 2 mm, grand axe = 5 mm), soit une surface S d'éclairage d'environ 12 mm<sup>2</sup> (caractéristique de la diode Laser) ; et un volume d'échantillon éclairé d'environ 12 mm<sup>3</sup>,

la concentration cellulaire maximale C admise dans l'échantillon testé doit correspondre à cette condition : (recherche du nombre de cube comme illustré ci-dessous pouvant être inclus dans un cube référence de volume V<sub>c</sub> = 1 mm<sup>3</sup>)

$$\rightarrow C < V_c / (L_m)^3$$

soit  $C < 15\,625 \cdot 10^9$  plaquettes/ L



(rappel : concentrations usuelles de 150.10<sup>9</sup> à 450 .10<sup>9</sup> plaquettes/ L, les différentes concentrations de PRP préparés respectent donc cette condition)

Remarque : pour une valeur de concentration moyenne de 300.10<sup>9</sup> plaquettes/L, le nombre moyen N de plaquettes éclairées dans 12 mm<sup>3</sup> sera proche de 3,6.10<sup>6</sup> et le nombre de couche de plaquette aléatoirement placées dans l'axe du faisceau sur l'épaisseur de l'échantillon sera de 67 (racine cubique de 300000). Pour l'épaisseur d'échantillon considéré de 1 mm, l'écart moyen entre deux cellules sera donc d'environ L<sub>m</sub>=15 μm >> λ.

Enfin, puisque la surface du spot lumineux excitateur est proche de 12 mm<sup>2</sup>, et pour ne prendre en compte que la transmission collimatée, le choix du capteur photoélectrique s'est porté sur une photodiode dont la surface sensible est de 7.5 mm<sup>2</sup> avec un rendement de conversion significatif entre l'intensité lumineuse captée et le courant électrique généré (rapport signal/bruit important).

Les caractéristiques techniques de tous ces éléments sont fournis dans le paragraphe 3.2 (partie III).

### **3. FRAGILIMÈTRE dispositif de mesure par dialyse lente**

Le Fragilimètre, appareil entièrement automatique conçu initialement pour mesurer la fragilité osmotique des hématies, a fait l'objet d'une étude de faisabilité et d'un projet de réalisation tous deux conduits par J. Didelon, ingénieur INSERM (77).

J. Didelon a réalisé un document scientifique et technique complet permettant de comprendre les différentes techniques mises en œuvre à la réalisation de cet appareil.

Pour cette raison, ce présent document ira à l'essentiel du descriptif technique du dispositif de mesure (cœur du système), sans s'attacher aux autres organes (mécaniques, électroniques, informatiques) qui permettent l'automatisation et l'analyse des différents signaux, décrits dans un document intitulé :

"Conception et réalisation d'un appareil de mesure  
de la résistance osmotique de la membrane de l'hématie" (96')

Le Fragilimètre, qui repose sur une technique validée pour mesurer la fragilité osmotique des membranes érythrocytaires par le suivi de l'hémolyse, permet après adaptation (principalement logicielle) de suivre la résistance osmotique des plaquettes. Le dispositif de mesure réalise et quantifie la décroissance graduelle de la force ionique, et utilise un procédé optique pour caractériser le comportement des cellules.

#### **3.1. L'information "force ionique"**

Le principe est de soumettre les plaquettes de façon continue, par dialyse lente à travers une membrane, à l'action d'un milieu de force ionique décroissante au cours du temps. Cent soixante  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire à étudier sont injectés dans une enceinte de mesure constituée par une membrane semi-perméable (Spectra POR avec un seuil de coupure de 10 kDa / Spectrum Medical Industrie, Inc, USA). L'ensemble est plongé dans une cuve de 90 mL d'eau distillée thermostatée. Les plaquettes sont soumises à une force ionique variant de 0,155 M (isotonicité) à 0,02 M (milieu hypotonique) sur une durée de 20 minutes.

Le dispositif de mesure est présenté sur la figure 21.

Indépendamment des caractéristiques de filtration de la membrane semi-perméable, la forme du porte échantillon est étudiée de façon à respecter diverses conditions :

- assurer une bonne stabilité mécanique du support ;
- constituer une surface d'échange la plus grande possible avec le milieu extérieur pour un volume intérieur le plus faible possible ;
- conserver la suspension homogène, en limitant l'épaisseur à 1 mm.

Pour connaître en temps réel la force ionique dans la suspension étudiée, deux sondes de conductance sont placées dans la cuve d'eau distillée. Le principe repose sur une mesure de conductivité (fonction inverse de la variation de résistance), correspondant à une variation de courant électrique entre les deux pôles. L'analyse électronique de cette mesure permet de déterminer la concentration ionique (élément conducteur), c'est à dire la force ionique dans la cuve.

Rappel théorique (97):

La loi d'Ohm est la base de tout raisonnement électrique :

$$U = R \cdot I$$

Tension (en V) = Résistance (en Ohm) × Courant (en A)

Pour une solution d'électrolytes comprise entre 2 plaques parallèles, de section S séparées par une distance  $\ell$ , constituant une cellule à conductivité; sa résistivité est :

$$\gamma = 1/R \cdot \ell/s \quad \text{en Ohm}^{-1} \text{ m}^{-1}$$

le coefficient R dépend de la nature de l'électrolyte et le rapport  $\ell/s$  dépend de la géométrie de la cellule de mesure.

Puisque le passage du courant dans un électrolyte est assuré par le déplacement ionique, la conductivité  $\gamma$  de la solution, qui caractérise son aptitude à conduire le courant, est fonction :

- de la concentration C des ions dans la solution,
- des charges électriques portées par les ions ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ).

Les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  possèdent des charges opposées, et se déplacent dans des sens contraires (fonction de l'attraction entre anode et cathode du champ électrique créé). Ce double déplacement détermine

la conductivité : plus la concentration ionique est élevée plus la résistance au passage du courant est faible, d'où une augmentation de la conductivité.

La connaissance des valeurs de la conductivité réelle (ou de la force ionique) dans la suspension passe par la mesure des limites haute et basse de résistance. Un étalonnage journalier permet de définir ces bornes :

- force ionique minimale (0) pour l'eau distillée,
- force ionique maximale pour 160  $\mu\text{L}$  de solution isotonique (0,155 M) injectée dans la cuve.

Remarque : il est impératif de procéder à un contrôle de la température. Cette dernière, déterminée pour les mesures (généralement de 37°C) doit être stable et identique pour l'étalonnage et pour les mesures. La température modifie certaines caractéristiques (conductance, osmose). Afin de prendre en compte la valeur réelle de conductivité par une homogénéisation du contenu de la cuve, une agitation permanente est réalisée (barreau magnétique, 600 t/min)

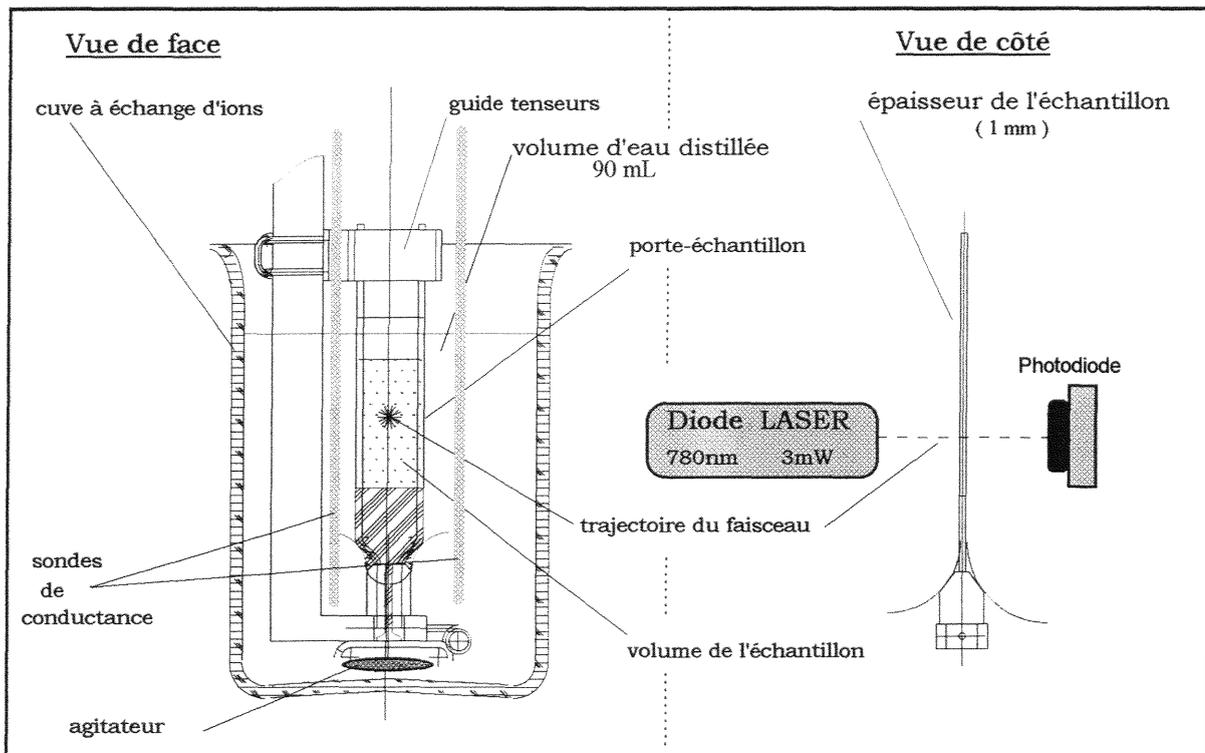


Figure 21 : représentation du dispositif de mesure du Fragilimètre.

### **3.2. L'information "transmission lumineuse"**

Le choix des caractéristiques de la source lumineuse a été précisée dans le paragraphe 2-2-3. Avant de traverser la cuve, le faisceau incident collimaté (diode laser,  $\lambda = 780$  nm, 3mW) est réfléchi par une lame semi-transparente pour ne récupérer que 10% de l'intensité initiale. Le centre du porte échantillon dans sa partie la plus large (10 mm) est placé dans l'axe optique (entre la diode laser et la cellule photoélectrique). Sa position (verticale) est choisie pour que le spot lumineux éclaire la suspension cellulaire à mi-hauteur de son volume. L'épaisseur de l'échantillon est de 1 mm. (fig 21).

Le capteur photoélectrique (BPW20 de chez Telefunken) est caractérisé par une grande sensibilité (33 nA/lx), une linéarité dans la plage d'utilisation, et un temps de réponse de 3,5  $\mu$ s. Sa réponse spectrale est optimale pour une longueur d'onde comprise entre 600 et 800 nm.

Un micro-ordinateur PC (microprocesseur pentium 133 MHz) gère l'acquisition simultanée et le traitement de trois paramètres (transmission lumineuse, conductance dans la cuve, température).

### **3.3. Rappels : application aux hématies**

La connaissance des propriétés mécaniques de la membrane érythrocytaire et en particulier de sa résistance osmotique aux solutions hypotoniques, présente un intérêt diagnostique pour le clinicien. En effet, de nombreuses pathologies hémolytiques influencent cette résistance (maladies hémolytiques auto-immunes, sphérocytoses héréditaires, ...).

Quelques appareils permettent d'étudier les propriétés rhéologiques de la membrane, mais ils restent encore du domaine de la recherche car ils se révèlent difficiles d'utilisation en routine. Aucun cependant ne réalise spécifiquement la mesure de la résistance des membranes jusqu'à leur rupture et seule la méthode manuelle dite de DACIE est utilisée aujourd'hui dans les laboratoires d'Hématologie.

Dans ce travail, les auteurs proposent de mesurer la résistance des membranes à l'hémolyse à l'aide d'un appareil de conception nouvelle (Fragilimètre). Pour suivre l'hémolyse, la variation de lumière transmise est analysée en fonction du temps et en fonction de la force ionique. La mesure est effectuée sur une période de 500 s, temps suffisant pour provoquer l'hémolyse totale (la variation de la pression osmotique engendrée au niveau de la cellule provoque l'ouverture de pores par lesquels s'échappe l'hémoglobine). La force ionique de la suspension décroît progressivement de 0,155 M à 0,04 M. Cent soixante  $\mu$ L d'une solution de

sang dilué au  $1/40^{ème}$  sont nécessaires (dilution autorisant l'application des lois optiques de la diffusion).

Les résultats obtenus (fig 22) informent directement sur la résistance de la membrane. Les déterminations des transmissions, initiale, à 50 % et totale permettent d'apprécier, comparativement à la technique de DACIE, les caractéristiques de l'hémolyse. La validation de la méthode a porté sur l'analyse d'échantillons de sang témoins prélevés depuis moins de 6h. et/ou incubés 24h à 37°C, afin de les fragiliser. Un test est également en cours actuellement sur des plaquettes sanguines.

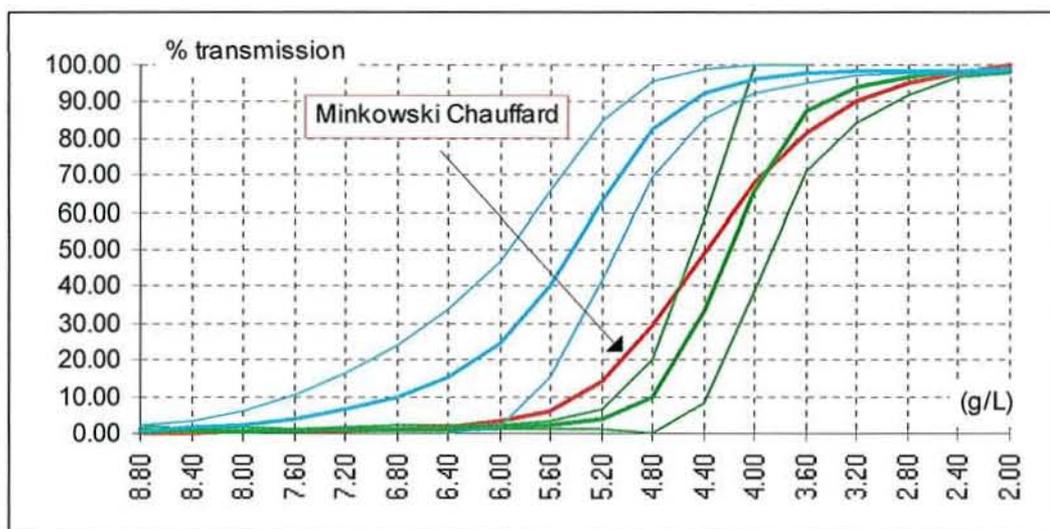


Figure 22 : résultats de la fragilité osmotique des hématies. Courbes des différents signaux de transmission obtenus, en fonction de la diminution de la concentration en électrolytes minéraux, de 24 échantillons de sang natifs (vert) et incubés 24 h à 37°C (cyan) ainsi que d'un échantillon de sang pathologique (rouge)

Actuellement des études complémentaires sont menées afin de préciser et de valider cette technique automatique de mesure de la fragilité osmotique des hématies.

### **3.4. Adaptation du logiciel informatique**

Afin de caractériser la fragilité osmotique érythrocytaire, l'ordinateur calcule des indices exprimés soit en temps soit en force ionique, pour les seuils de transmission de 2 % (transmission initiale), de 50 % et de 98 % (hémolyse totale). La résolution du système de mesure est de 440 points en 500 s (échantillonnage de 1,12 s) et la précision qui est fonction du mode d'acquisition choisi (carte multi-fonctions Digimétrie PC-ADC 12B8V/D) est de 12 bits. Les signaux électroniques étant compris entre 0 et 5 volts, la précision est de 1,22 millivolts.

L'application de la technique "Fragilimètre" au suivi de la résistance osmotique des plaquettes doit passer par une étude préliminaire. Dans le souci d'évaluer un maximum de paramètres, le logiciel informatique a été modifié sur certains points :

- La résolution (nombre de points acquis pour les signaux de transmission et de conductance durant la mesure, quelle que soit sa durée) est passée de 440 à 600 points, soit un échantillonnage d'un point par seconde (la fréquence d'acquisition a été choisie à 1 Hz);
- Les indices sont calculés pour les seuils de 2 %, 25 %, 50 %, 75 % et 98 %, en fonction du temps et en fonction de la force ionique, ainsi que les pentes à ces différents points ;
- Des fonctions de régression sont calculées, afin de définir les pentes moyennes pour les parties de la courbe de transmission exprimée en % de la pleine échelle (entre 2 % et 25 %, entre 25 % et 50 %, entre 50 % et 75 % et entre 2 % et 50 %) en fonction de la force ionique ;
- Traçage de la courbe de transmission en unités arbitraires en fonction du temps, avec affichage des valeurs initiale, finale, minimale et maximale de transmission, ainsi que l'amplitude du signal pour le seuil 98 % et la moyenne de la pente entre les seuils 2 % et 25 %.

L'informatique permet l'édition des résultats (fig 23). La partie 1 A représente la courbe de transmission lumineuse (en unités arbitraires) en fonction du temps. La partie 1 B donne la variation de transmission lumineuse en fonction du temps (notée Transmit., exprimée entre 0 et 100 % de la pleine échelle) et la force ionique dans la solution en fonction du temps (notée Conduct., exprimée entre 0,150 et 0,02 M). Enfin la partie 1 C représente la courbe de variation d'intensité de lumière transmise (exprimée entre 0 et 100 % de la pleine échelle), déduite des courbes de la figure B, en fonction de la concentration ionique du milieu ( $I = \sum n_i \cdot Z_i^2$ ). Un tableau (fig. 18) résume les paramètres calculés et pouvant être utilisés pour caractériser la résistance osmotique : temps et concentration saline pour les seuils de transmission : initiale, 25 %, 50 %, 75 % et 100 %, et valeurs de la dérivée en ces points.

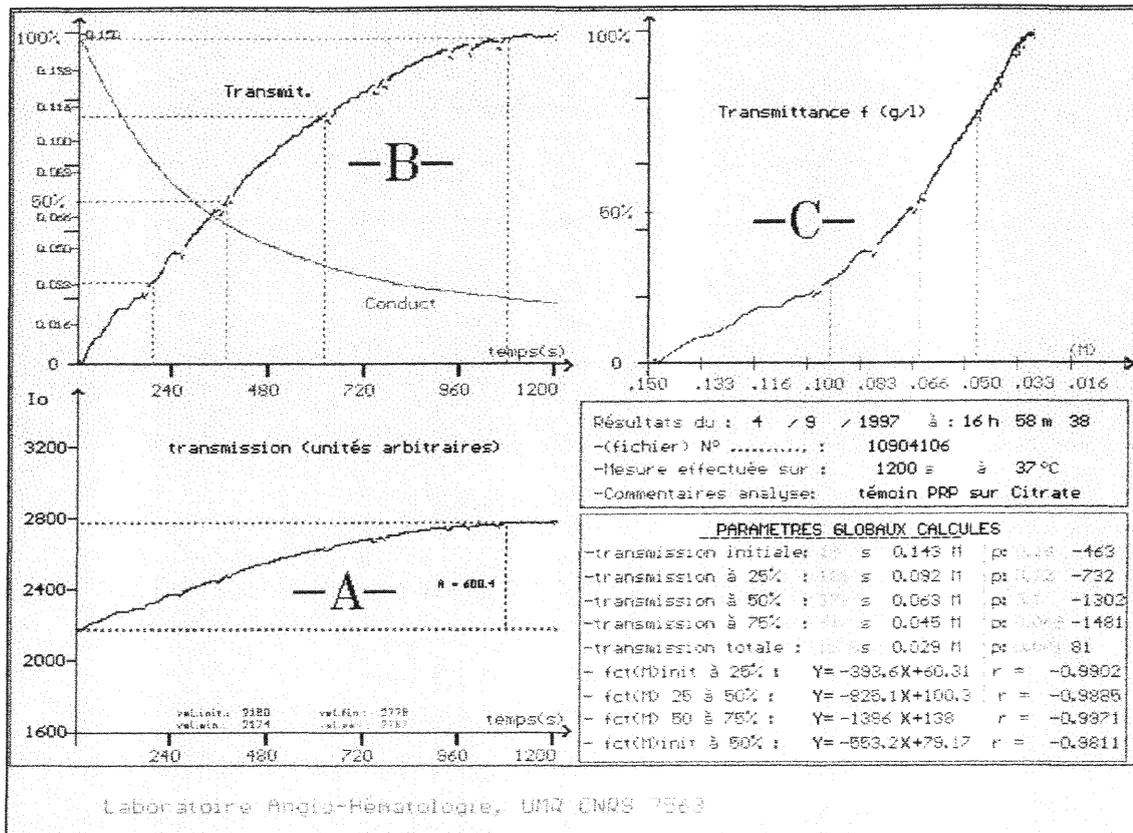


Figure 23 : résultats de la résistance osmotique plaquettaire, édités par le *Fragilimètre*. A : courbe de transmission lumineuse (unités arbitraires) en fonction du temps. B : courbe de transmission lumineuse et de la concentration en sels de la suspension (exprimée entre 0 et 100 % de la pleine échelle) en fonction du temps. C : courbe de transmission lumineuse rapportée entre 0 et 100% en fonction de la concentration en ions. Tableau des paramètres caractéristiques calculés.

### 3.5. Etat de la question

Le dispositif de mesure autorise l'analyse de suspensions plaquettaires. Comme pour les hématies, la variation de transmission lumineuse à travers l'échantillon complétée de la quantification de la force ionique (décroissante), fournissent des renseignements sur le comportement morphologique des plaquettes.

Mais, la sensibilité du système vis à vis des plaquettes, plus petites, plus transparentes, et d'activation facile et rapide, reste à vérifier. La figure 24 permet de constater que les plaquettes ont un pouvoir d'extinction réduit vis à vis des hématies. L'amplitude des signaux caractéristiques de la résistance osmotique des plaquettes sera donc plus faible.

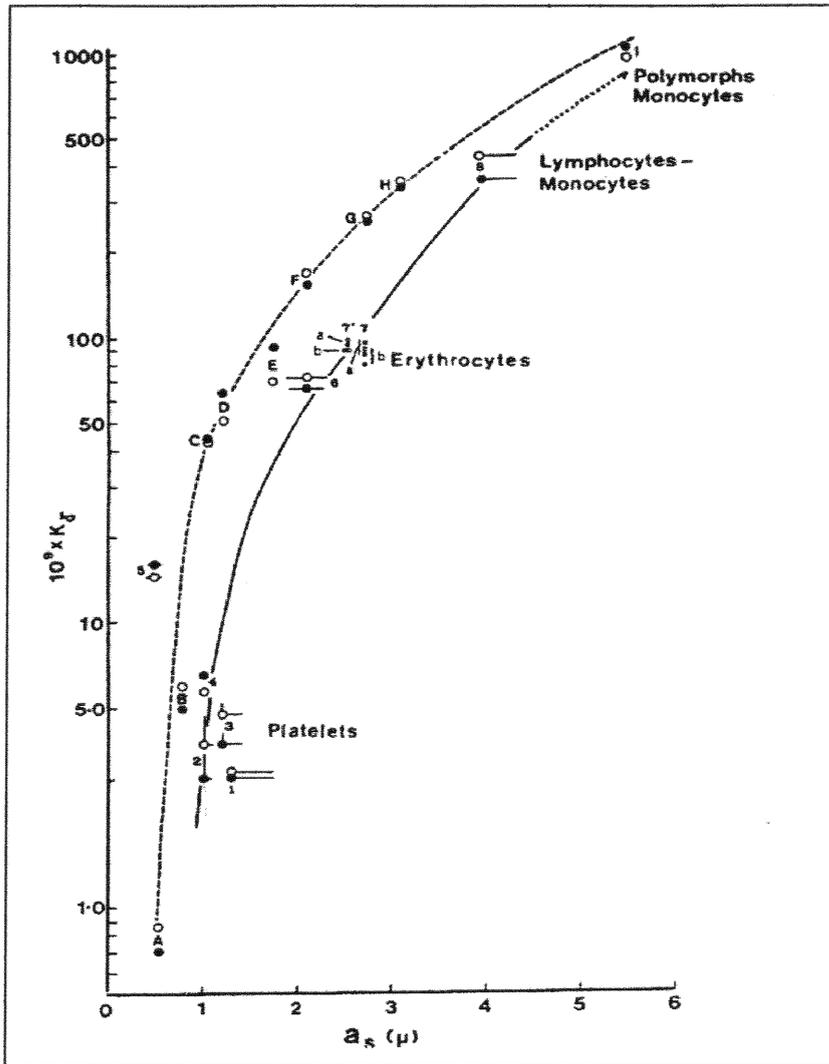


Figure 24 : coefficient d'atténuation ( $K$ ) pour des particules (cellules) vis à vis du rayon ( $a_s$ ) de leur sphère équivalente.  
 Les valeurs expérimentales obtenues sont illustrées par la courbe tracée en continue [1 : "guanine" plaquettes (modèles), 2 : plaquettes de lapin, 3 : plaquettes humaines, 4 : latex2, 5 : latex1, 6 : latex4, 7 : érythrocytes humains, 7' de lapins : normaux (a) durcis (b)] Les valeurs déduites des travaux de Latimer sont illustrées par la courbe en pointillé [(A): mitochondries, (B) : bactéries, © : latex2, (D) : fragments de chloroplastes, (E) : latex 3.5 $\mu$ , (F) : chloroplastes, (G) : érythrocytes humains normaux, (H) : érythrocytes plus larges, et (I) : grosses cellules]. D'après Frojmovic (90).

De plus, en fonction des arguments théoriques et bibliographiques concernant la diffusion lumineuse sur des plaquettes qui sont appelées à gonfler, et des expériences menées (analyse de la réponse du système) il est important d'apporter une explication sur les phénomènes observés.

## **4. PRELEVEMENT et PREPARATION des PLASMAS RICHES en PLAQUETTES (PRP)**

Le sang est prélevé à l'établissement de Transfusion Sanguine du C.H.U. de Nancy Brabois chez des donneurs sains et bénévoles, d'âge compris entre 20 et 60 ans, qui se sont présentés pour un don. Le prélèvement sanguin est placé dans des tubes anticoagulés.

Chaque prélèvement s'est effectué après une autorisation consentante du donneur pour l'utilisation de l'échantillon en recherche.

### **4.1. PRP standards obtenus à partir de sang total :**

#### **Etudes préliminaires :**

Pour les études préliminaires (réglages, étude de la réponse du système), deux anticoagulants : acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) et citrate, sont utilisés. Les suspensions plaquettaires sont préparées par centrifugation lente à 160 g pendant 10 min, ce qui permet d'obtenir un PRP à une concentration proche de  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L.

#### **Résultats, statistiques :**

L'évaluation de la technique, par l'estimation de l'influence des conditions préanalytiques, est réalisée par l'analyse de suspensions plaquettaires (notées PRP) préparées de manière habituelle comme dans les laboratoires d'hémostase (par centrifugation lente : voir avant). Les concentrations finales sont comprises entre  $150 \cdot 10^9$  et  $500 \cdot 10^9$  plaquettes/L. Deux anticoagulants sont comparés : citrate de sodium à 3.8% (0.129M) et EDTA. L'influence de la concentration cellulaire est testée sur plusieurs PRP de donneurs différents (pour un même PRP, cinq échantillons sont préparés à des concentrations différentes par dilution avec du plasma autologue : PPP).

La standardisation du test est effectuée à partir de 32 prélèvements sur des donneurs différents.

Les autres séries de mesures n'ont concerné que des PRP préparés de la même façon à partir de sang total de donneur.

Remarque : les tests RCH ont été réalisés sur des PRP (sur citrate et EDTA) ajustés à environ  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L.

## **4.2. PRP obtenus à partir de concentrés plaquettaires préparés par aphérèse :**

### **Evaluation de la viabilité au premier jour (j=0)**

Une comparaison de la qualité des concentrés plaquettaires préparés avec des séparateurs différents (cf tableau VII) est évaluée. Les mesures sont effectuées sur des échantillons dilués pour obtenir une concentration cellulaire proche de  $300.10^9$  plaquettes/L (dilution avec plasma autologue). Un essai de mesure avec des concentrés purs est pratiqué.

Tableau VII : description des séparateurs utilisés.

Séparateurs	Nb de poncture	Volume de sang total traité	Nb Conc. à J0	Nb Conc. à J0, J2, J5 et J6	Nb Conc. à J0, J2, J5 Protocole Amicus
Spectra (Cobe)	2	4 - 5.5 L	12	5	
MCS (Haemonetics)	1	4 L	12	5	
AS 104 (Fresenius)	2	6 L	6	-	
Amicus (Baxter)	2	4 - 5.5 L	12	-	10
Excel (Didéco)	2	5 - 5.5 L	-	5	

remarque : 400 à 600 mL de PRP d'une concentration comprise entre 1 à  $1,5 \cdot 10^{12}$  plaq/L sont prélevés par donneur; les deux dernières colonnes définissent le nombre de concentrés par type étudiés soit à J-0, soit en conservation de J-0 à J-6.

### **Evaluation de la viabilité de concentrés plaquettaires conservés**

Des mesures de résistance osmotique de concentrés plaquettaires conservés à 22°C (chambre thermostatée : Platelet Incubator, Helmer Inc., Revendeur Hemotech) en agitation oscillatoire sont effectuées sur le Fragilimètre, pour 20 poches différentes : 5 Concentrés Standards de Plaquettes (CSP), 5 Concentrés de plaquettes préparés en Aphérèse (CPA) sur Excel, 5 CPA sur Spectra, 5 CPA sur MCS. Le prélèvement d'échantillon sur les poches est réalisé en conditions stériles. Il est pratiqué les jours J=0, J=2 ou J=3, J=5 et J=6. Les tests sont menés sans ajustement des concentrations (160 µL du concentré pur sont introduits dans la membrane du porte échantillon).

### **Protocole d'évaluation du séparateur Amicus**

Une évaluation du séparateur Amicus (uniponcture) sur le même principe d'étude que précédemment (suivi de 10 concentrés différents pendant la conservation) est réalisée par des mesures de résistance osmotique (programme et technique adaptés à la mesure pour une dialyse lente) et des tests de réponse au choc osmotique (programme et technique adaptés à la mesure dans le cas d'une dilution immédiate de l'échantillon avec de l'eau distillée). Ces deux techniques sont appliquées sur le Fragilimètre.

## 5. ANALYSE de la REPONSE du SYSTEME

L'application de la technique proposée par le Fragilimètre à l'étude du comportement osmotique des plaquettes par dialyse lente doit être précédée d'une approche de la réponse du système.

Les plaquettes présentent des caractéristiques différentes de celles des érythrocytes, tant du point de vue de leurs propriétés optiques que de leur résistance au choc osmotique.

Pour évaluer la technique et corréler les propos théoriques, différentes expérimentations sont effectuées :

- En premier lieu, la loi de diffusion des ions NaCl à travers la membrane semi-perméable, par la mesure de la conductivité, est vérifiée et permet de connaître l'allure de la courbe de décroissance de la force ionique en fonction du temps,
- En second lieu, la stabilité dans le temps de la diode laser est testée,
- La troisième étape consiste, après optimisation du signal lumineux recueilli, de vérifier l'influence d'une possible sédimentation, ce qui constituerait une source d'erreur pour l'interprétation de la variation d'intensité.
- Un test de quantification de l'intensité de diffusion lumineuse autour de la cuve de mesure est réalisé. Le but recherché est la compréhension de la variation de lumière observée, en corrélant cette étude expérimentale avec les données théoriques.
- Enfin, les relations entre les modifications morphologiques des plaquettes et la variation d'intensité lumineuse mesurée sont abordées à l'aide d'expériences complémentaires.

Remarque : les valeurs de transmission lumineuse, présentées dans cette étude, sont exprimées soit en valeurs arbitraires (déduites des conversions : intensité lumineuse captée → tension → valeur décimale), soit en pourcentage de la pleine échelle. En valeur arbitraire, le zéro correspond à l'extinction totale du faisceau (aucun photon recueilli sur la photodétectrice).

## 5.1. Evolution de la force ionique au cours du temps

Les suspensions préparées pour le suivi de l'hémolyse des érythrocytes ou de la résistance osmotique des plaquettes, correspondent à des solutions isotoniques d'une force ionique de 0,155 M. Une série de mesures a montré que la force ionique diminue graduellement pour passer de 0,155 à 0,02 M en 20 minutes. La courbe sur la figure 25 permet d'observer l'évolution de force ionique au cours du temps pendant les mesures (décroissance exponentielle, diffusion des ions NaCl à travers la membrane du porte échantillon).

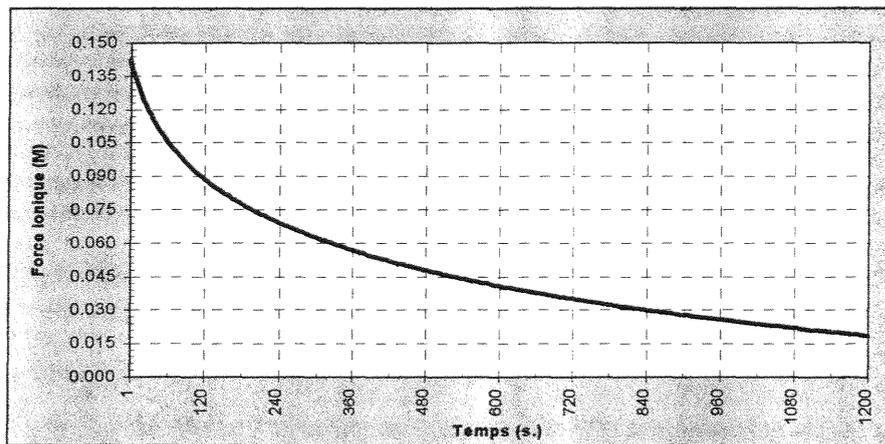


Figure 25 : courbe représentant la décroissance de la force ionique de l'échantillon en fonction du temps.

La force ionique décroît rapidement dans les premières minutes, et plus modérément ensuite, induisant la notion de dialyse lente. Les paramètres susceptibles d'influencer l'allure de cette courbe sont la température, le système d'agitation et l'encrassement de la membrane semi-perméable au cours des mesures (obstruction des pores). La taille des pores (seuil de coupure des membranes semi-perméables) est prédominante quant à la vitesse de diffusion des ions Na-Cl (plus le diamètre des pores est grand, plus les échanges sont favorisés).

Remarque :

- à 10 minutes, la force ionique dans la suspension est proche de 0,040 M.
- à 20 minutes, la force ionique dans la suspension est proche de 0,020 M.
- à 30 minutes, la force ionique dans la suspension est proche de 0,014 M.

## **5.2. Stabilité dans le temps de l'intensité d'émission de la diode laser**

La stabilité de l'intensité lumineuse émise par la diode laser est étudiée durant une heure à compter de sa mise en fonctionnement. Cette mesure est effectuée après mise en place de la cuve d'eau distillée (90 mL) et du porte échantillon (vide).

L'analyse de la courbe (fig 26) montre une stabilité correcte en intensité du faisceau lumineux après un délai de 15 minutes ("chauffage"). L'intensité transmise tend vers une limite égale à  $3080 \pm 20$  (valeur décimale correspondant à une transmission à travers le porte échantillon sans suspension de cellules).

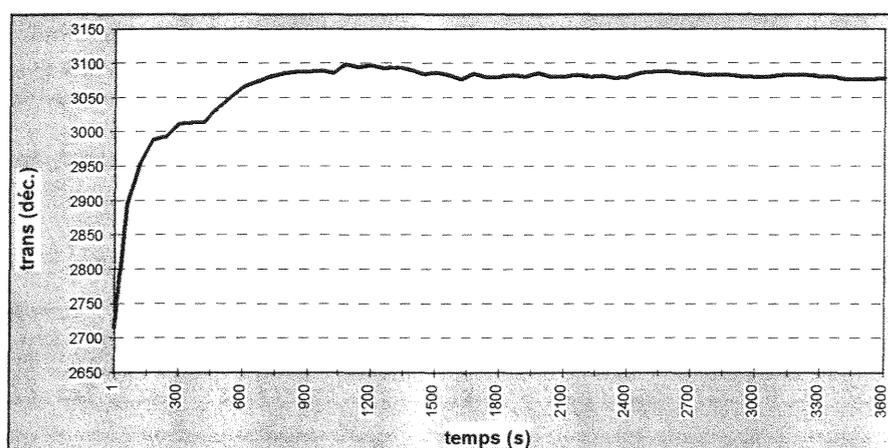


Figure 26 : représentation de la stabilité en intensité lumineuse de la diode laser.

## **5.3. Le facteur de sédimentation**

Une sédimentation des cellules pendant la mesure serait à l'origine de la variation du signal lumineux (par gravité, les plaquettes sont amenées à "tomber" au cours du temps vers le fond du porte échantillon). Cette chute favorise une augmentation de la concentration des particules dans la partie inférieure. Au point d'éclairage à travers le porte échantillon, l'extinction du faisceau est plus conséquente et l'intensité lumineuse captée en est ainsi diminuée.

Pour évaluer cet artéfact, des mesures sur des suspensions plaquettaires par dialyse contre une force ionique de 0,155 M sont effectuées (cuve de mesure remplie avec 90 mL d'eau physiologique). L'équilibre des forces impliquées permet de maintenir les plaquettes dans un état physiologique normal (différence de pression osmotique nulle), et d'observer si leur sédimentation se produit. La figure

23 présente les résultats pour deux mesures sur un même PRP (concentration proche de  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/mm<sup>3</sup>, anticoagulant citrate) mais avec des conditions de dialyse différente :

- une dialyse "normale" : contre l'eau distillée (0 M) ;
- une dialyse "inhibée" : contre l'eau physiologique (0,155M).

Ce test simple (fig 27) montre que la variation d'intensité lumineuse, pour des conditions de dialyse inhibée, est d'une amplitude restreinte par rapport à une mesure dite "classique". L'affaiblissement du signal est lent et progressif. En considérant qu'aucune modification morphologique des plaquettes n'intervient, le phénomène mesuré semble correspondre à une évolution de l'extinction liée à la concentration cellulaire. Dans ces mêmes conditions expérimentales, une mesure sur 60 minutes montre une même chute graduelle et continue de l'intensité lumineuse (aucun plateau n'est atteint). La variation de transmission lumineuse  $\Delta_{trans}$  (fig 23) est égale à environ 200 unités décimales (concentration de la suspension de  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L).

Remarque : La valeur des seuils initiaux de transmission est fonction, pour un même plasma, de la concentration cellulaire. Suivant les résultats présentés ultérieurement (cf partie IV, §3), un écart de 200 unités décimales correspond à une différence de concentration de l'ordre de  $100 \cdot 10^9$  plaquettes/L.

L'interprétation prudente de ces différents résultats permet d'envisager qu'une sédimentation effective des particules se réalise progressivement. Elle induit une légère extinction du faisceau lumineux (environ 8) et quel que soit le degré de dialyse pratiqué, la variation de lumière induite par les modifications morphologiques des plaquettes reste prédominante. Le changement de volume (entre autre) des plaquettes placées en hypotonie induit quant à lui une augmentation de la transmission lumineuse.

Remarque : cette notion de sédimentation ne sera certainement pas à négliger après la phase de fragilisation des plaquettes dans le Fragilimètre. En effet, des variations du signal après le seuil de 100% de transmission semble parfois exister. De plus, même placée en condition physiologique (0,155 M), la température de 37°C n'est pas optimale pour la conservation plaquettaire, elle induit une dégradation des cellules.

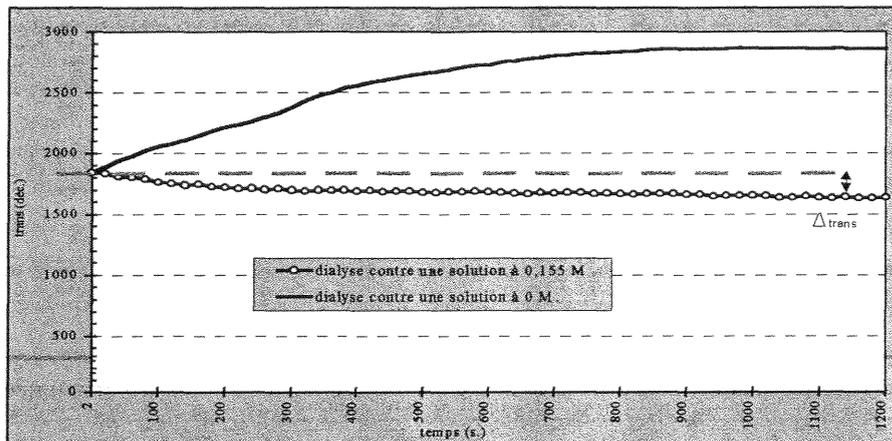


Figure 27 : courbes de transmission lumineuse en fonction du temps pour un même PRP avec une dialyse contre deux milieux de forces ioniques différentes (0 et 0,15 M).

Une mesure notée "classique" de fragilisation de plaquettes par dialyse lente correspondra à une augmentation de l'intensité de la transmission lumineuse captée. Cette variation de transmission atteint un plateau après environ 16 minutes pour une suspension de plaquettes citrate et après environ 5 minutes pour une suspension de plaquettes issue d'un prélèvement de sang total sur EDTA.

#### **5.4. Diffusion lumineuse autour de la cuve**

L'hypothèse de départ repose sur le fait que les principaux constituants plaquettaires (plaquette et contenu) restent enfermés à l'intérieur de l'enceinte à échantillon (membrane semi-perméable). Le deuxième point important concerne l'utilisation d'une source lumineuse collimatée de longueur d'onde  $\lambda=780$  nm. Ces deux éléments complétés par les lois de Beer-Lambert établiront que l'absorption lumineuse pendant le test à travers des PRP est constante et relativement faible dans les conditions de mesures fixées (cf spectre d'absorption d'un PRP fig 16). Une autre propriété optique semble donc induire ces variations d'intensité de transmission pendant les mesures de résistance osmotique plaquettaire.

Un dispositif est spécialement conçu pour approcher les phénomènes de diffusion. Ce test permet d'effectuer des mesures d'intensité lumineuse autour de la cuve de 90 mL. Une petite plate-forme permet de maintenir la cuve d'eau distillée dans sa position normale (sans régulation de température), et favorisant la rotation du support de la cellule photoélectrique autour de cette cuve (en respectant la distance entre le porte échantillon et ce capteur). Des mesures classiques de résistance osmotique avec un même PRP témoin (sur 10 minutes, temps suffisant pour atteindre le maximum de

transmission pour des plaquettes prélevées sur EDTA) sont réalisées pour des positions déterminées de la photodiode ( $0^\circ$  à  $90^\circ$  par pas de  $3^\circ$ , fig 28).

Les données géométriques de ce banc test permettent de considérer que :

- l'éloignement noté  $l$  entre le centre de la cuve (où se situe le porte échantillon) et la cellule photoélectrique est constant et égale à 50 mm,
- la distance séparant deux positions consécutives du capteur est égale à  $(l \cdot \sin \alpha)$  ; pour  $\alpha = 3^\circ$ , cette distance sera de 2.616 mm,
- la surface active du capteur est de  $7 \text{ mm}^2$  (forme carrée), soit 2.645 mm de côté,

En résonnant sur un plan (repère 2 dimensions, fig 24), la rotation par pas de  $3^\circ$  du segment (côté) définissant la surface active du capteur permet de construire un cercle continu (le centre correspond à la position du porte échantillon). En d'autre terme, toute l'information lumineuse émise du porte échantillon (centre) dans toutes les directions de ce plan ne peut échapper à l'élément photosensible. Le dispositif mis en œuvre permet d'obtenir une image de la diffusion sur un plan horizontal.

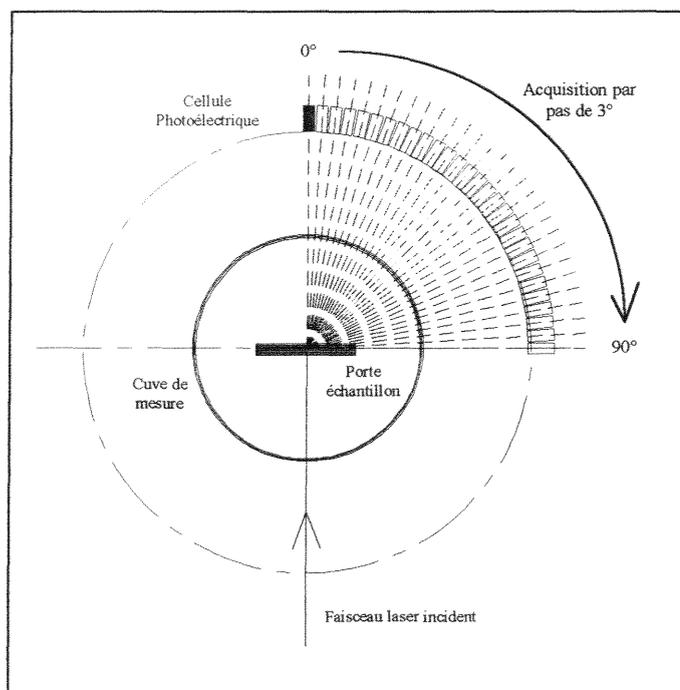


Figure 28 : vue du dessus du dispositif de mesure de l'intensité lumineuse diffusée autour de la cuve (sur un axe horizontal).

Remarque : cette étude ne fait état que de la diffusion avant (angles compris entre  $0^\circ$  et  $90^\circ$ ) car des mesures effectuées à des angles supérieurs (rétrodiffusion) se sont révélées infructueuses (intensité recueillie non significative, problème de sensibilité du capteur compte tenu du faible signal à capter)

En supposant que la diffusion est homogène autour du faisceau excitateur, pour un angle donné il est possible de calculer l'anneau de diffusion (fig 29).

Equations : Intensité de diffusion ( $I_d$ ) dans un anneau

- de rayon intérieur ( $2\pi l \sin \alpha$ ),
- de largeur  $d$  (côté du carré photosensible du capteur),
- dont le centre est placé à  $l = 50$  mm de l'échantillon sur l'axe du faisceau incident

$$I_d = \left[ \left( \frac{2\pi l \sin \alpha}{d} \right) \cdot \Delta_s \right]$$

avec  $\Delta_s$  : valeur mesurée par le dispositif de mesure pour l'angle considéré,

$$K = \left[ \left( \frac{2\pi l \sin \alpha}{d} \right) \right] \rightarrow I_d = K \cdot \Delta_s$$

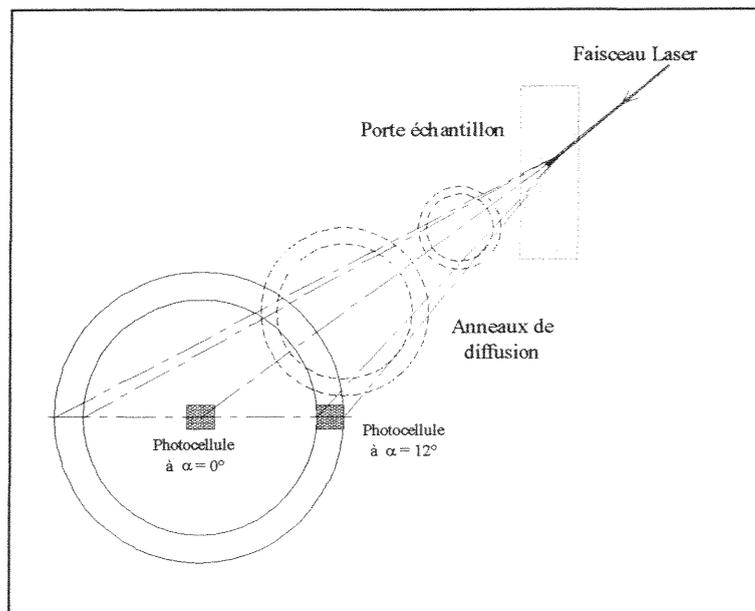


Figure 29 : intégration de la diffusion en anneaux par rapport à la position angulaire du capteur lumineux (exemple pour  $\alpha = 12^\circ$ ).

Valeurs de K pour les différentes positions angulaires du capteur :

pour	$\alpha = 0^\circ$	$\rightarrow$	$K = 0$
	$\alpha = 3^\circ$	$\rightarrow$	$K = 6.004$
	$\alpha = 6^\circ$	$\rightarrow$	$K = 11.990$
	$\alpha = 9^\circ$	$\rightarrow$	$K = 17.945$
	$\alpha = 12^\circ$	$\rightarrow$	$K = 23.850$
	$\alpha = 15^\circ$	$\rightarrow$	$K = 29.690$
	$\alpha = 18^\circ$	$\rightarrow$	$K = 35.449$
	$\alpha = 21^\circ$	$\rightarrow$	$K = 41.110$
	$\alpha = 24^\circ$	$\rightarrow$	$K = 46.660$
	$\alpha = 27^\circ$	$\rightarrow$	$K = 52.080$
	$\alpha = 30^\circ$	$\rightarrow$	$K = 57.357$

Le test consiste à mesurer l'intensité lumineuse captée par la photocellule pour toutes les positions angulaires prédéfinies (la limite mécanique du dispositif est fixée pour  $\alpha = 150^\circ$ ). Les résultats montrent qu'à partir de  $24^\circ$ , l'intensité recueillie est constante pendant le temps de la mesure et

relativement faible. Ainsi, pour des analyses significatives, les mesures suivantes se sont limitées à la plage  $0^{\circ}$ - $30^{\circ}$ .

Quatre séries d'étude (quatre PRP de donneurs différents, anticoagulant EDTA), permettent de vérifier la méthode, et l'une d'entre elle est choisie pour présenter les résultats.

Les courbes données sur la figure 30 montrent que l'intensité globale diffusée diminue rapidement pour les angles supérieurs à  $9^{\circ}$  par rapport à l'intensité de la transmission collimatée recueillie à  $0^{\circ}$ .

Les résultats pour une position fixe du capteur (exemple pour  $6^{\circ}$ ) permettent d'observer une diminution progressive de l'intensité lumineuse captée en fonction du temps, alors que la transmission collimatée augmente dans le même temps. Les amplitudes des courbes, pour les signaux correspondant aux angles différents de  $0^{\circ}$  (correspondant uniquement à la diffusion), sont différentes, mais l'allure reste la même.

Remarque : à  $\alpha = 3^{\circ}$ , le capteur lumineux reste sensible à la fois à la transmission collimatée et à la diffusion, d'où un signal relativement important avec une variation moins nette.

A partir de l'intégration théorique (anneaux de diffusion), proposée précédemment et en s'appuyant sur les valeurs expérimentales, la courbe notée "somme" a été construite (elle correspond à la somme des anneaux de diffusion pour les angles où l'intensité mesurée est significative). Cette dernière confirme l'opposition au niveau du sens de variation entre la transmission collimatée et la transmission diffuse. Cette "reconstruction" permet ainsi de montrer que l'augmentation de la transmission directe à  $0^{\circ}$  est fortement liée à la diminution de la diffusion.

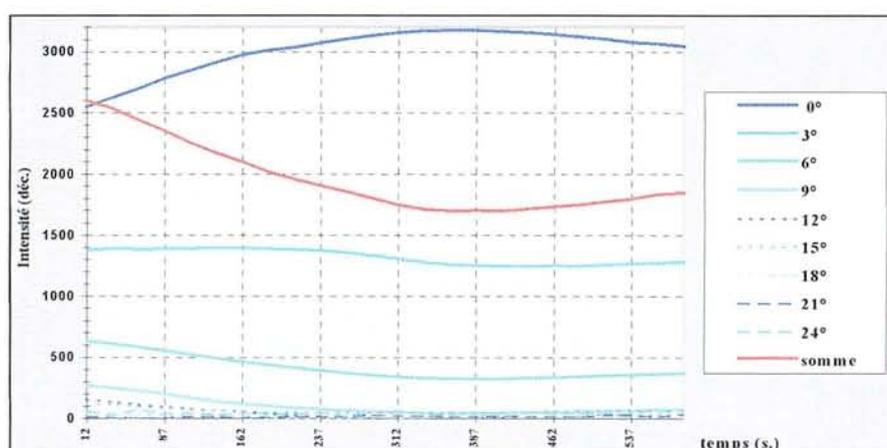


Figure 30 : courbes d'intensité de diffusion autour de la cuve en fonction du temps et pour un même PRP.

Cette expérience confirme qu'à la longueur d'onde excitatrice de 780 nm, les plaquettes sont des particules diffusantes, et que la variation de transmission directe (collimatée) est

consécutives principalement à la variation de diffusion. (intensité lumineuse incidente - intensité de la lumière diffusée = transmission captée).

## 5.5. Dialyse contre des solutions de forces ioniques différentes

Cette étude consiste à effectuer des mesures à partir d'un même PRP (anticoagulant EDTA), en plaçant dans la cuve de 90 mL des solutions de forces ioniques différentes. Le but de cette expérience est d'observer l'influence de la pression osmotique, créée au niveau de la suspension plaquettaire, sur l'amplitude et l'allure des courbes de variation de transmission lumineuse.

L'analyse de ces différents résultats montre que :

- L'amplitude de la variation de lumière transmise est fonction du degré de dialyse réalisé pendant les mesures (fig 31). Plus la force ionique de la solution dans la cuve se rapproche de 0.155 M (isotonicité), plus l'amplitude du signal lumineux est faible. Ce phénomène confirme le résultat obtenu pour l'étude d'une possible sédimentation. Pour une différence de force ionique convergeant vers zéro entre l'échantillon et la solution dans la cuve, l'intensité mesurée reste quasi-constante dans le temps.

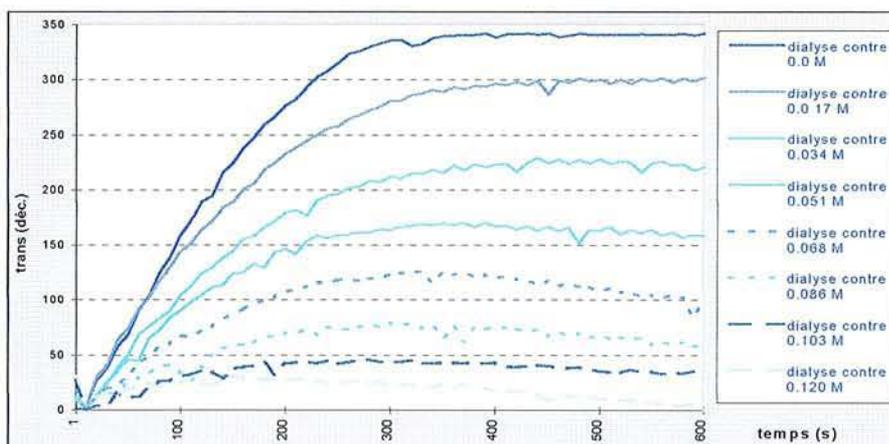


Figure 31 : courbes de transmission lumineuse en valeurs arbitraires (décimales, le seuil initial de transmission est ramené à 0) en fonction du temps, obtenues pour des dialyses contre des milieux de force ionique différente.

- Ces courbes, exprimées maintenant entre 0 et 100 % de la pleine échelle (fig 32), tendent à se confondre principalement pour les forces ioniques comprises entre 0,150 et 0,083M. L'allure de chaque courbe est identique. Le seuil 100 % de transmission est atteint dans les mêmes temps.

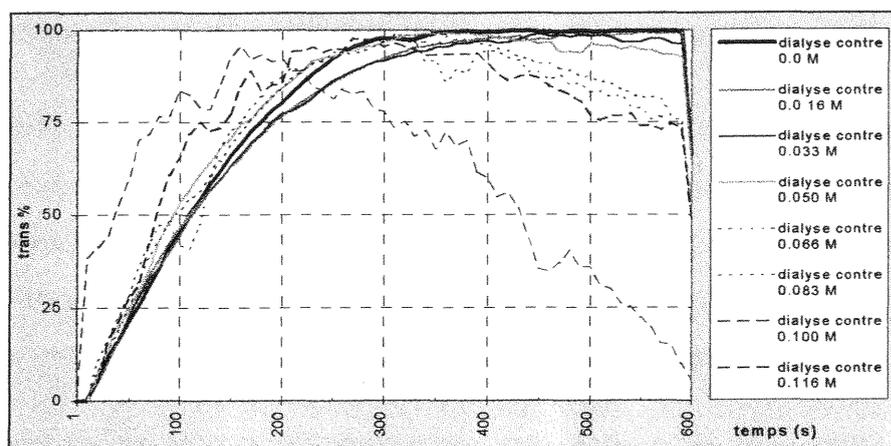


Figure 32 : courbes de transmission lumineuse exprimées entre 0 et 100 % de la pleine échelle en fonction du temps, obtenues pour des dialyses contre des milieux de force ionique différente.

Un test complémentaire a été réalisé en plaçant dans la cuve de 90 mL une solution hypertonique à 0,250 M. La mesure est effectuée sur un PRP (concentration usuelle, issu de sang total prélevé sur citrate) pendant 20 minutes. Dès la fin du test, la solution initiale hypertonique de la cuve est remplacée par 90 mL d'eau distillée. Et, tout en conservant dans le porte échantillon la suspension précédente, une nouvelle mesure est lancée. La figure 33 représente l'évolution dans le temps de la transmission acquise pendant ces deux phases consécutives (dialyse contre un milieu hypertonique, puis dialyse contre un milieu hypotonique). Les résultats pour une mesure classique en hypotonicité sur ce PRP sont illustrés et la courbe débute à 1200 secondes pour une comparaison plus aisée. La transmission initiale pour chaque courbe est la même. Les plaquettes restent donc dans le même état morphologique.

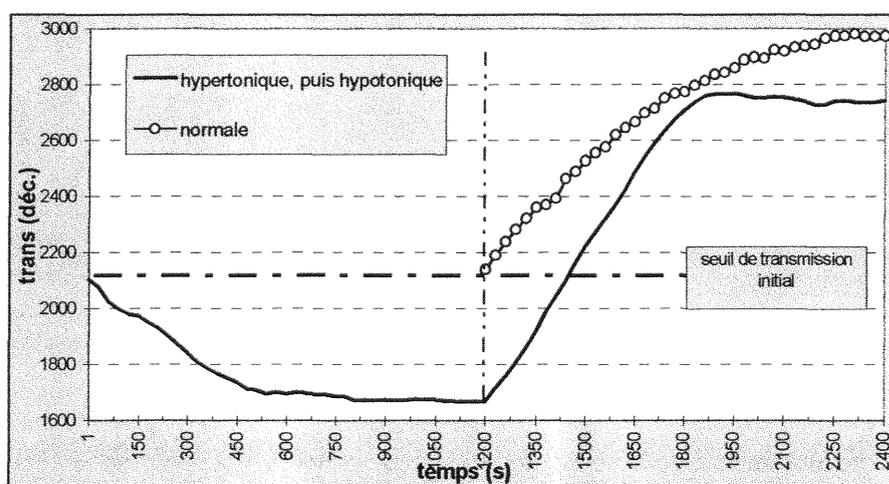


Figure 33 : courbes de transmission lumineuse pour deux phases consécutives (mesure avec dialyse contre un milieu hypertonique (0,25 M), puis dialyse contre un milieu hypotonique (0 M). La mesure classique pour le même PRP débute à 1200 s.

## 5.6. corrélation avec le volume moyen

Le suivi de la mesure du volume moyen des plaquettes pendant les expériences de fragilisation osmotique, doit renseigner sur son influence en rapport avec la variation de lumière. L'automate Counter-Coulter (Coultronics France, installé au service cytologie Hôpital central de Lionnois), permet d'effectuer ce test. La relation entre la décroissance de la force ionique et le gonflement des plaquettes pourrait ainsi être approché.

Des tests sur le Fragilimètre sont réalisés pour un même PRP (anticoagulant EDTA, pour éviter une agrégation et des erreurs d'interprétation de l'automate). Les temps de mesure varient de 1 minute à 20 minutes (gamme de fragilisation). A la fin de chaque test, l'échantillon de PRP récupéré est analysé par l'automate de comptage. Cet appareil fournit principalement trois paramètres : le nombre de cellules par unité de volume ( $\mu\text{L}$ ), le volume moyen (MPV) et le rapport moyen de distribution en volume (PDW : demi largeur de la gaussienne mesurée à mi-hauteur divisée par le volume moyen).

La courbe (fig 34) permet d'observer l'augmentation de la taille moyenne des plaquettes en fonction de la durée de la mesure effectuée, qui peut être corrélée à la force ionique exercée sur les cellules.

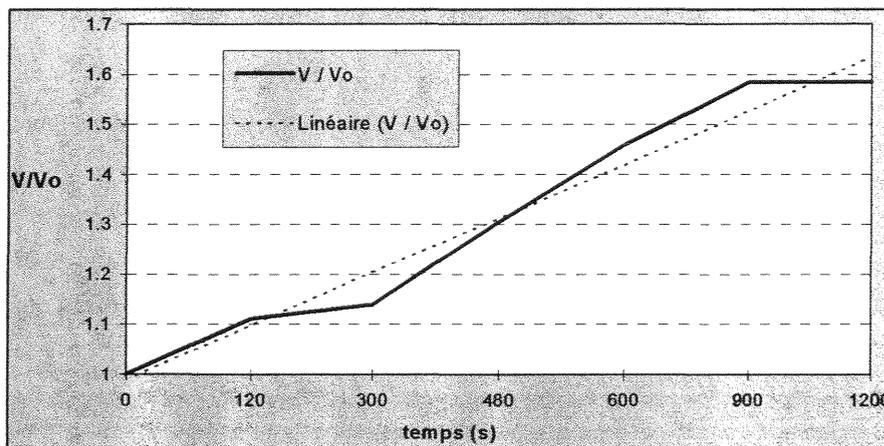


Figure 34 : évolution du volume moyen des plaquettes après passage dans le Fragilimètre. (V : volume initial , Vo : volume après fragilisation)

Le tableau VIII résume les valeurs caractéristiques de cette expérience. La numération reste quasi constante quelle que soit la force ionique finale des suspensions. Une légère baisse est remarquée après 10 minutes de fragilisation.

Tableau VIII : valeurs fournies par l'automate Counter-Coulter pour un PRP après passage dans le Fragilimètre avec différents temps de mesure

Temps	Numération	MPV	PDW
(s)	* 10 <sup>3</sup> plaq/ $\mu$ L	volume moyen plaquettaire	rapport moyen de distribution
0	275	7,2	16,7
2	260	7,9	16,9
5	266	8,2	17,3
8	261	9,4	18
10	230	10,5	18,2
15	214	11,4	18,3
20	150	11,5	18,7

La gaussienne (fig 35) représentant la distribution en volume des plaquettes montre une asymétrie plus importante à droite pour les suspensions ayant été soumises à une force ionique inférieure à 0,080 M. La population plaquettaire est plus hétérogène pour de faibles forces ioniques. Un pourcentage de "grosses" plaquettes est dénombré (partie droite de la courbe), avec des volumes atteignant 20-25 fL.

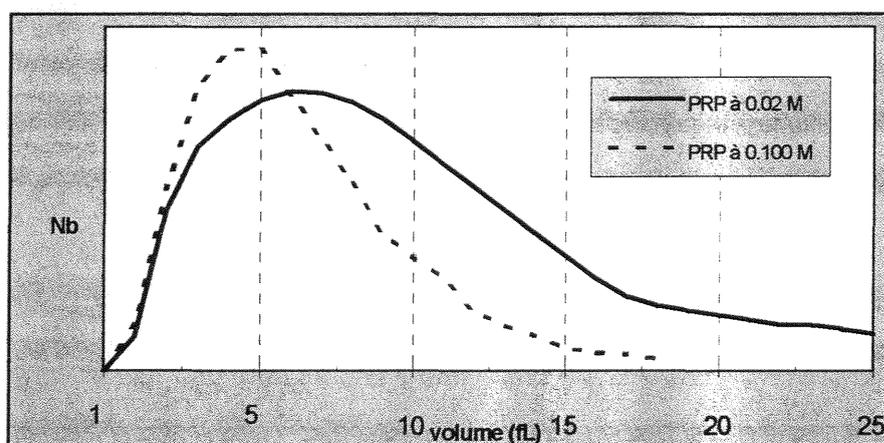


Figure 35: représentation de deux gaussiennes représentant la distribution en volume de deux PRP soumis par dialyse lente à deux forces ioniques différentes (0,02 M et 0,1 M).

L'interprétation des résultats obtenus avec des automates de comptage pour caractériser les plaquettes soumises à différentes forces ioniques, doit se faire avec prudence. En effet, que ce soit par une mesure de conductivité des particules (technique utilisé par le système Counter-Coulter) ou de diffusion optique aux petits angles (Technicon H2, Bayer Inc.), une dilution importante de la suspension analysée avec une solution isotonique est pratiquée. Ce paramètre "biaise" en quelque sorte les résultats, puisque les PRP à analyser ne répondent pas à ces conditions d'ionité (0,155 M). Les plaquettes gonflées au préalable par une force ionique inférieure à 0,155 M, retournent en

milieu physiologique, et peuvent reprendre leur forme originale. Les valeurs des volumes sont relatives, mais la notion d'augmentation de volume reste significative du comportement mesuré.

### **5.7. Microscopie Optique**

Pendant les mesures de résistance osmotique, les plaquettes soumises à une force ionique décroissante changent de forme, gonflent, voire se lysent. Pour apprécier ces phénomènes, l'observation au microscope optique est d'une grande utilité. Les images obtenues pourraient permettre de caractériser la morphologie des plaquettes et de corréler la variation de lumière transmise avec les éléments définissant l'aspect des plaquettes fragilisées.

Malheureusement, la plaquette par son activation aisée, par sa petite taille, par sa relative transparence, n'est pas d'une observation facile. Le microscope à contraste de phase, même s'il apporte un meilleur contraste des contours, ne permet pas une visualisation correcte et surtout interprétable.

Le souci premier étant de caractériser des modifications morphologiques : changement de forme (passage d'une forme initiale discoïdale → sphérique → apparition de pseudopodes, ... → forme complexe), augmentation du volume par l'influx d'eau, et la lyse éventuelle, cette technique mise en œuvre n'a pas permis d'enregistrer et d'éditer des images significatives.

Les observations réalisées ont tout de même permis de visualiser certains éléments engendrés par une force ionique décroissante :

- apparition de dendrites (pseudopodes),
- apparition de forme sphérique,
- transparence des plaquettes de plus en plus significative,
- agrégation minimale des plaquettes sous EDTA.

### **5.8. Microscopie Electronique à Balayage**

La microscopie électronique à balayage permet d'obtenir une très bonne qualité d'observation, mais elle reste onéreuse et le protocole de préparation des échantillons n'est peut-être pas sans incidence sur la morphologie des plaquettes. Une étape de fixation d'une suspension

de PRP à la suite d'une fragilisation de 20 minutes (par dialyse lente dans le Fragilimètre : force ionique finale de 0,02 M), des prises de vue à différents grossissements (9000, 11200 et 28000) ont été réalisées.

Cette microscopie permet d'observer la forme, la taille, le contour des membranes. La première photo (fig 36) illustre les plaquettes pour un grossissement de 9000. Une forme générale sphérique se distingue avec des dimensions quasi-identiques (forme "ballonisée").

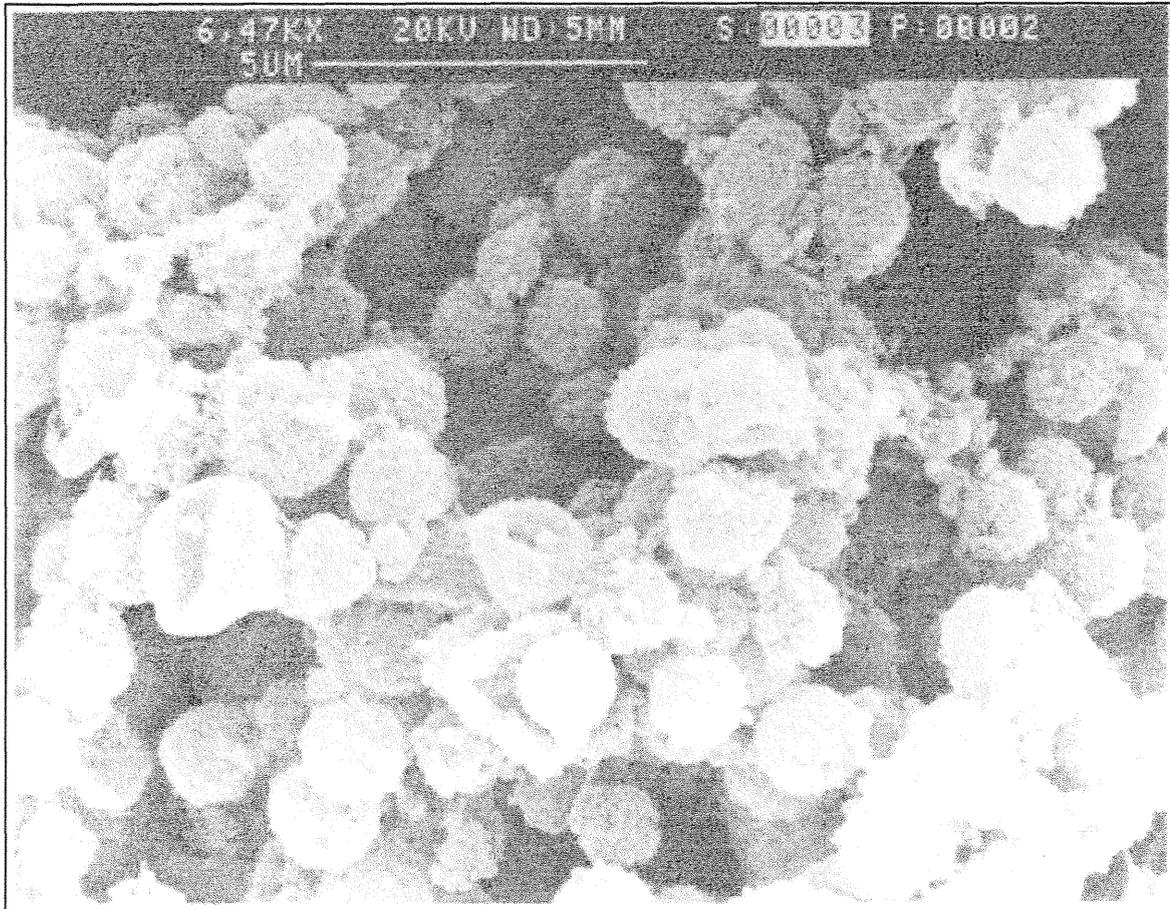


Figure 36 : morphologie des plaquettes observées en microscopie électronique à balayage (grossissement de 9000) pour une force ionique de 0,03M.

La deuxième photo présentée (fig 37) a été choisie parce qu'elle permet de visualiser des plaquettes soumises à une contrainte osmotique de 0,03M et des plaquettes normales (grossissement de 11200). La présence de ces quelques plaquettes d'une forme classique (relativement aplatie), légèrement activées, est probablement due à une contamination (minimale, seules cellules visualisées dans cet état). La comparaison de ces deux catégories de cellules met en avant la grande différence au niveau de la structure des membranes. Les plaquettes fragilisées présentent une membrane du type "lunaire" ou "éponge" avec apparition de microvésicules et de trous à leur surface.

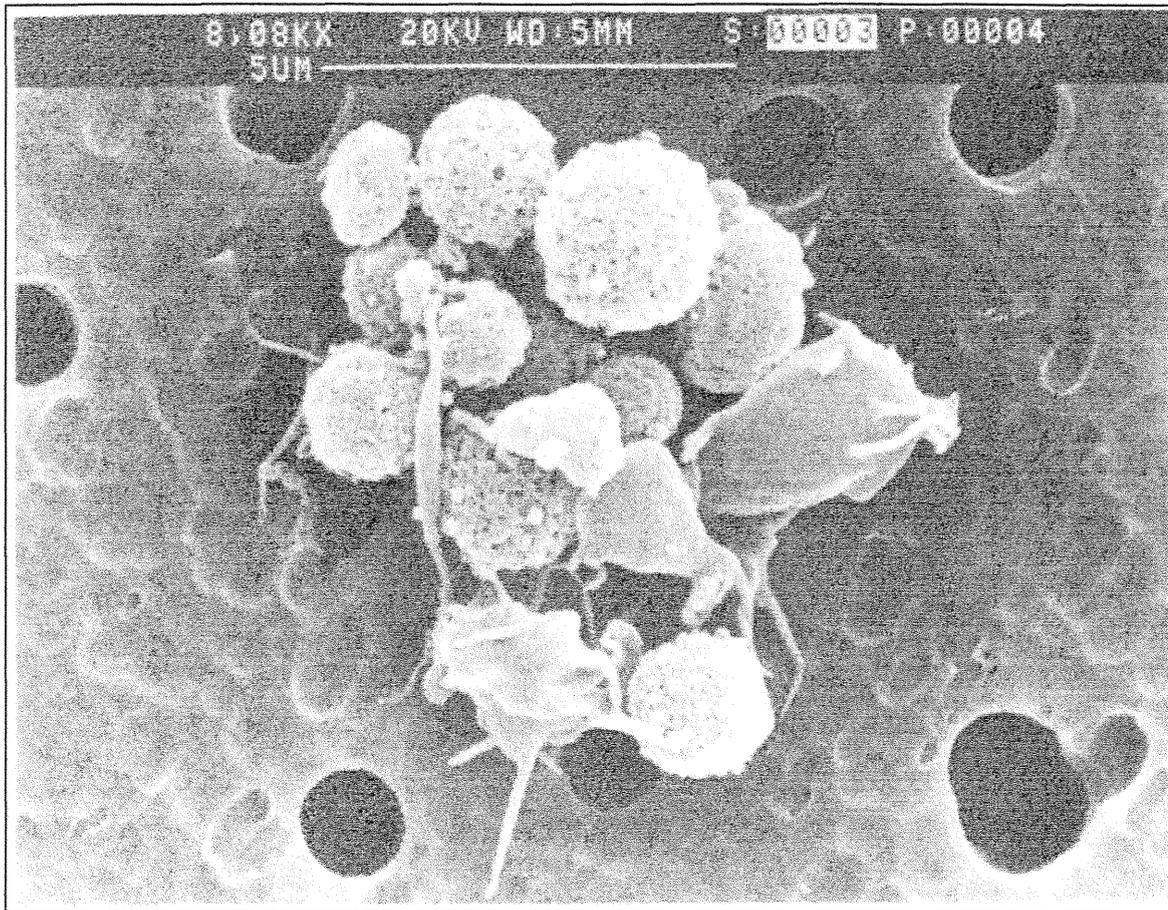


Figure 37 : morphologie des plaquettes observées en microscopie électronique à balayage (grossissement de 11200) pour une force ionique de 0,03M (cliché choisi pour la présence d'une contamination limitée de plaquettes quasi normales, légèrement activées)

La troisième photo (fig 38) choisie pour son grossissement plus important (28000) permet l'observation de deux plaquettes et principalement de leur forme, du volume, et de la structure membranaire. La surface est totalement différente de celle d'une plaquette normale. Les dimensions correspondent bien à une plaquette gonflée, passage d'une forme elliptique à une forme sphérique où seul le petit axe noté a s'étire (le grand axe b reste constant).

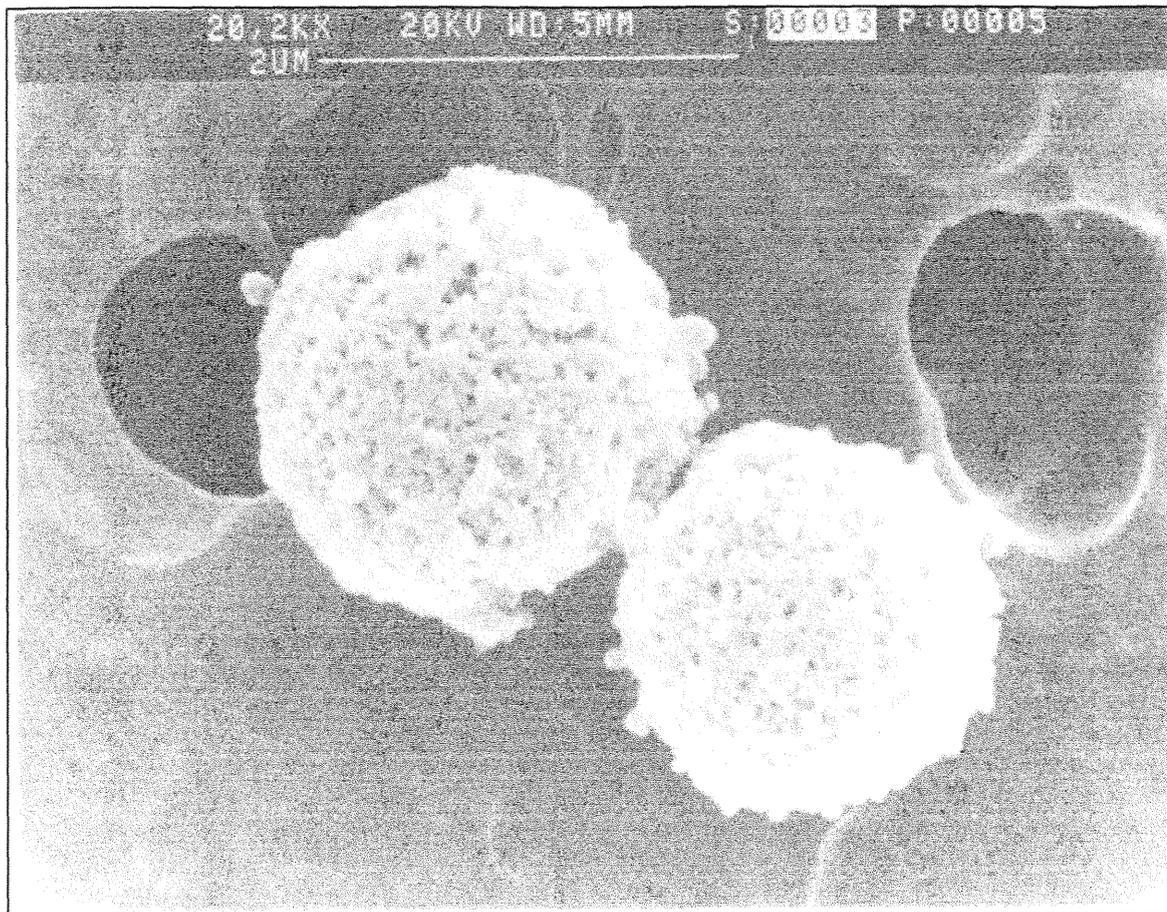


Figure 38 : morphologie des plaquettes observées en microscopie électronique à balayage (grossissement de 28000) pour une force ionique de 0.03M.

### **5.9. Etat de la question**

L'utilisation routinière du Fragilimètre pour le suivi de l'hémolyse des érythrocytes, a permis d'effectuer les premiers tests de résistance osmotique plaquettaire. L'observation des résultats a permis de construire les bases de l'adaptation du logiciel informatique.

Une fois fixée les modalités de préparation des suspensions à analyser, et les temps de mesure, des expériences devaient être pratiquées afin d'expliquer les raisons pour lesquelles une variation de lumière transmise était observée, et ainsi corrélérer nos remarques aux hypothèses théoriques.

Résultats expérimentaux :

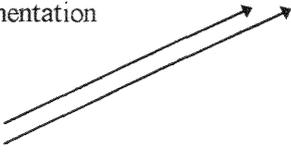
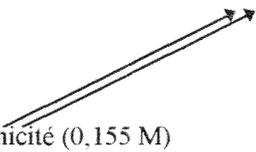
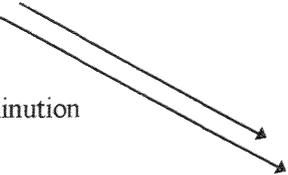
- ⇒ La membrane semi-perméable autorise une dialyse lente et permet une diminution progressive de la force ionique dans l'échantillon (fig 25).
- ⇒ Sachant que l'intensité de la diode laser est stable après 20 minutes (préchauffage), la mesure effectuée pour une dialyse contre une solution à 0,155M dans la cuve (90 mL),

c'est à dire en isotonicité, montre que la sédimentation cellulaire n'est pas un facteur prédominant. Ainsi pour une mesure dans les conditions normales : dialyse contre de l'eau distillée, l'augmentation de transmission lumineuse constatée n'est pas induite par une sédimentation (fig 27).

- ⇒ La quantification de l'intensité de transmission diffusée autour de la cuve, par une reconstruction des anneaux de diffusion, permet de constater que l'augmentation de la transmission collimatée est due en majeure partie à la diminution du phénomène de diffusion sur les cellules (fig 30). On peut considérer que l'intensité recueillie sur le capteur photoélectrique est déduite du calcul : intensité incidente moins l'intensité diffusée.
- ⇒ Les expériences menées sur le même PRP mais avec des dialyses contre des solutions d'ionicités différentes, montrent une corrélation entre l'amplitude du signal et la force ionique finale exercée au niveau des cellules (fig 31-32, courbes d'allure semblable). Ces résultats appuient la thèse selon laquelle le seuil de gonflement des plaquettes est fonction de la contrainte osmotique appliquée, soit une corrélation possible entre l'amplitude du signal de transmission et le pourcentage moyen de gonflement.
- ⇒ La mesure effectuée dans des conditions initiales d'hypertonie (solution à 0.25 M dans la cuve) montre une décroissance de la transmission lumineuse captée en fonction du temps (fig 33). Parallèlement, la force ionique dans la suspension augmente de 0,155 M (départ) à environ 0,25 M (final). Cette suspension maintenue dans le porte échantillon en fin de test et replacée dans une condition d'hypotonie habituelle (cuve remplie de 90 mL d'eau distillée), permet d'observer une augmentation du signal de transmission. Cette variation est cependant différente du point de vue de l'allure et de l'amplitude par rapport à la courbe obtenue pour un test classique (la morphologie initiale des plaquettes pour ces deux mesures est différente : "normale" pour la mesure classique et forme rétractée pour la mesure qui suit le test en hypertonie). Le sens de variation du signal lumineux recueilli est donc fonction du sens de variation de la force ionique dans le porte échantillon. En considérant les faits établis de l'augmentation de volume des cellules placées en hypotonie et du rétrécissement de volume des cellules placées en hypertonie, il est à noter que la transmission lumineuse varie en fonction de ces mêmes phénomènes.

- ⇒ Les mesures, effectuées à l'aide d'un automate de comptage (Counter Coulter), du volume moyen des plaquettes soumises pendant des temps différents à une dialyse lente confortent le phénomène de gonflement des plaquettes. Ces mesures délicates dans la mise en œuvre, ne peuvent pas être considérées de façon formelle, car le liquide de veine des automates dilue de manière importante l'échantillon, ce qui ne respecte pas les conditions de mesure dans le Fragilimètre. Toutefois, ces résultats permettent d'approcher l'augmentation effective du volume moyen des plaquettes suivant la force ionique appliquée.
- ⇒ L'observation en microscopie optique semblait être la technique idéale pour illustrer les changements de forme, l'augmentation de volume des plaquettes suivant la contrainte osmotique. Mais les suspensions à analyser, en déséquilibre isotonique, sont composées de plaquettes fragilisées, instables. Au grossissement disponible pour le contraste de phase (40\*), la distinction en différentes catégories [cf technique Kunicki (27)] des plaquettes est délicate et imprécise. Les images numérisées ne présentent pas suffisamment de contraste et de netteté pour une exploitation et une illustration. Cependant un éclaircissement des cellules est observé pour une force ionique appliquée décroissante, ce qui conforte la notion de gonflement par influx d'eau, soit l'idée d'une dilution des constituants cytoplasmiques. De plus, aucun aspect de l'agrégation pour des plaquettes issues d'un prélèvement de sang total sur EDTA n'a été visualisé pendant les mesures de résistance osmotique. L'agrégation n'est donc pas le facteur de la variation de transmission recueillie.
- ⇒ Les photos réalisées en microscopie optique à balayage sur des suspensions de plaquettes fragilisées (force ionique de 0,03 M) présentent l'avantage d'une très bonne qualité du rendu (contraste et grossissement). Les plaquettes soumises à une dialyse progressive jusqu'au seuil de 0,03 M en force ionique dans la suspension analysée, sont dans un état physiologique semblable. Elles se présentent sous une forme "ballonisée" avec un état de surface très distinct de celui d'une plaquette normale (totalement lisse). La membrane de ces plaquettes semble trouée et son relief est caractéristique d'une structure "lunaire" ou "éponge". Le protocole préalable de fixation doit être exécuté rigoureusement et rapidement, après récupération de la suspension passée dans le Fragilimètre. Le principal souci, déjà évoqué, est d'observer la morphologie des plaquettes telle qu'elle est réellement dans les conditions de mesure.

Le bilan de ces expériences est significatif. Il s'approche des attentes théoriques et permet d'établir les principaux facteurs d'interprétation de la mesure :

Variation de la force ionique	Variation du volume des plaquettes	Variation du signal lumineux capté
stable, égale à 0,155 M  Isotonicité	nulle  	quasi constante  
isotonicité (0,155 M)   (0,03 M) hypotonicité	gonflement  	augmentation  
(0,25 M) hypertonicité   isotonicité (0,155 M)	rétrécissement  	diminution  

Les trois phénomènes : force ionique, forme et volume des plaquettes, intensité lumineuse recueillie sont étroitement liés. Le Fragilimètre révèle les modifications morphologiques des plaquettes en fonction de la pression osmotique exercée. Les résultats édités permettent d'approcher la cinétique de gonflement par influx d'eau. Les paramètres calculés caractérisent la résistance osmotique des membranes plasmiques.

La réalisation du test Réponse au Choc osmotique, utilisé par de nombreux auteurs et dont les résultats sont interprétés dans le sens du gonflement osmotique, permettra peut être d'apporter des confirmations quant aux caractéristiques fournies par le Fragilimètre pour des mesures de résistance osmotique en dialyse lente.

Remarque : une expérience de quantification de la sérotonine libérée, destinée à approcher le degré de lyse des plaquettes pendant les mesures de fragilisation, a été menée en collaboration avec un laboratoire de biochimie. Aucun résultat probant n'est à présenter. Le dosage est délicat compte tenu du faible poids moléculaire de cette substance (inférieur au seuil de coupure de la membrane semi-perméable utilisée dans le Fragilimètre). Une quantification de la sérotonine libérée par les plaquettes fragilisées pour des temps de mesure supérieurs à ceux correspondant au seuil de 100% de transmission aurait peut être apporté des résultats.

## 6. REALISATION du TEST "Réponse au Choc Hypotonique"

Le test RCH décrit dans la partie II-3, sans être utilisé en routine, reste la méthode instrumentale la plus pratiquée pour la caractérisation de la viabilité des concentrés plaquettaires.

Le Fragilimètre se devait donc de proposer également cette technique d'analyse. A partir d'une structure de base (dispositif optique et électronique), deux logiciels différents autorisent la gestion automatique de l'un ou l'autre des deux tests (dialyse lente ou choc).

Les utilisateurs disposeront ainsi des deux formules d'analyse : par choc et par dialyse lente. Cette double potentialité permettra d'approfondir les études d'interprétation de la variation de lumière transmise et permettra d'établir des corrélations entre les deux tests. Le test RCH, par des valeurs de référence publiées, apportera des précisions sur la mesure de la résistance osmotique des plaquettes par dialyse lente, quant à l'interprétation et à la recherche de paramètres les plus significatifs.

### 6.1. Adaptation au Fragilimètre

Pour réaliser le test RCH, la cuve est remplacée par un support à microcuve qui laisse passer le faisceau lumineux incident à travers la partie translucide de cette cuve (fig 39).

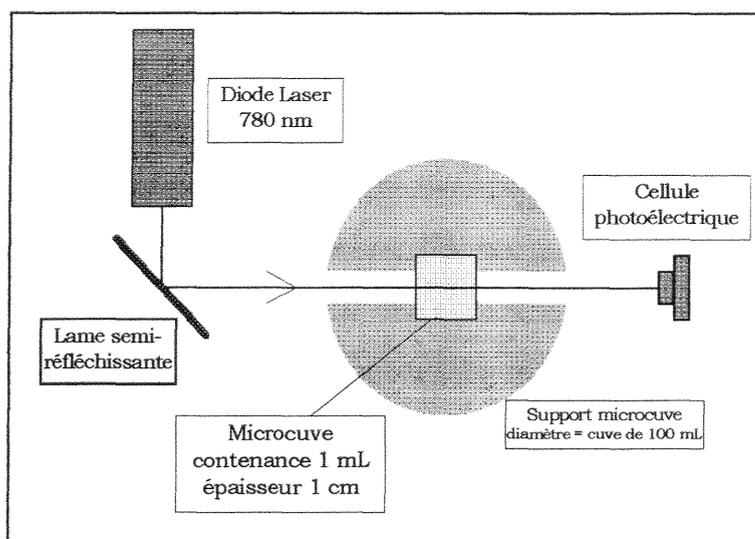


Figure 39 : dispositif de mesure pour analyser le test RCH

Le faisceau lumineux traverse la suspension plaquettaire à mi-hauteur de son volume. Le test s'applique à des PRP d'une concentration proche de  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L. La dilution pratiquée est fonction du choc choisi. Plus la dilution avec l'eau distillée est importante, moins les

plaquettes conservent leur potentiel de retour à une morphologie initiale. Le volume final après dilution doit être d'au moins 1 mL (caractéristique imposée par le choix des microcuvettes utilisées).

Dans cette phase préliminaire, où le but est l'application de cette technique RCH par le Fragilimètre, les adaptations se sont limitées à une simple fonctionnalité, tout en fournissant le logiciel informatique de gestion (commande automatique de l'appareil, acquisition et analyse des résultats). Les mesures de transmission lumineuse sont effectuées à température ambiante sans agitation de la suspension (objectif de fonctionnalité, dans un premier temps, sans modification mécanique importante). L'élaboration d'un kit de mesure RCH s'insérant dans le dispositif Fragilimètre actuel permettra d'envisager une régulation de température de la suspension, ainsi qu'une agitation.

#### Analyse (basée sur le test RCH décrit dans la partie II-3) :

Initialement, une mesure de "référence" en transmission lumineuse doit être réalisée. Elle correspond au seuil d'intensité capté par la cellule photoélectrique pour le PRP à étudier, dilué avec de l'eau physiologique (0,155 M). Cette valeur constante pendant la durée des mesures est stockée dans un fichier et servira lors des calculs de caractérisation du RCH.

Ensuite, la mesure type du RCH débute dès la dilution du PRP avec l'eau distillée. Le logiciel réalise l'acquisition du signal de transmission en 600 points pour une durée de mesure de 10 minutes. Le traitement ultérieur permet d'éditer une feuille de résultat (fig 40). La courbe A représente la variation de transmission lumineuse et la valeur "référence" toutes deux en valeurs arbitraires et en fonction du temps. La courbe B correspond à cette même variation exprimée entre 0 et 100 % de la pleine échelle en fonction du temps. Tandis que la courbe C, représente toujours la variation de transmission exprimée en %, mais par rapport au seuil minimal de transmission équivalent à la valeur "référence". Un tableau résume des temps caractéristiques et fournit les paramètres importants du test RCH :

- Temps correspondant à l'amplitude maximale : T (limite de gonflement des plaquettes) ;
- Amplitude maximale du signal par rapport à la référence en valeur arbitraire ;
- Amplitude du signal à T plus 8 minutes par rapport à la référence en valeur arbitraire ;
- Rapport des amplitudes (pourcentage de réversibilité des plaquettes).

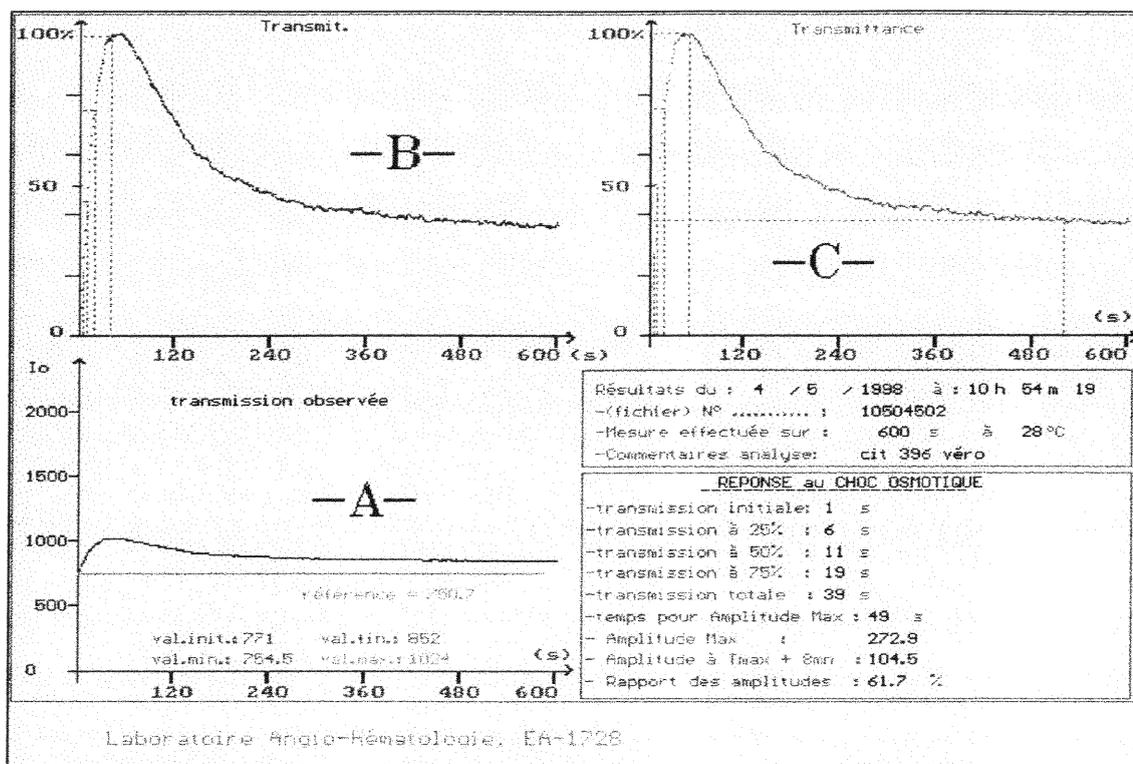


Figure 40 : Résultats du test RCH édités par le *Fragilimètre* .

A : courbe de transmission lumineuse (unités arbitraires) en fonction du temps. B: courbe de transmission lumineuse ( exprimée entre 0 et 100 % de la pleine échelle) en fonction du temps. C: courbe de transmission lumineuse rapportée entre 0 et 100% (0% calculé à partir de la valeur "référence") en fonction du temps. Tableau de paramètres caractéristiques calculés.

L'informatique permet une sauvegarde automatique des valeurs acquises et des références relatives à la mesure. Cette gestion des fichiers est très utile pour analyser les tests précédents et principalement pour récupérer les données sur un outil de statistique standard (exemple : Excel de Microsoft). Le logiciel adapté au *Fragilimètre* peut s'ouvrir à d'autres options de calculs et d'affichage.

#### Protocole de mesure retenu :

Suivant le dispositif de mesure proposé par le *Fragilimètre*, les différentes évaluations et optimisations ont permis de définir la plage idéale de concentration et de dilution :

- les concentrations sont comprises entre  $200 \cdot 10^9$  et  $450 \cdot 10^9$  plaquettes/L. Les suspensions plaquettaires étudiées correspondent à des PRP préparés de façon standard (voire § 4 partie III).
- la dilution est de  $\frac{1}{2}$  pour des volumes de PRP et d'eau distillée de 390  $\mu$ L chacun. La force ionique du mélange est de 0,0775 M.

### Premiers résultats :

Une série de mesures effectuée avec le test RCH sur des PRP témoins préparés à partir de sang total prélevé sur deux anticoagulants (EDTA et citrate) montre que :

- l'indice moyen de réversibilité pour des plaquettes prélevées sur citrate est de 48 %,
- l'indice moyen de réversibilité pour des plaquettes prélevées sur EDTA est de 22 %.

## **6.2. Etat de la question**

L'analyse bibliographique du test RCH (partie II, § 3.2) avait montré l'intérêt porté à cette technique. Le Fragilimètre propose désormais cette option supplémentaire de caractérisation de la résistance osmotique. Basé sur le même dispositif optique de mesure, une microcuve est le siège du choc osmotique (dilution retenue :  $\frac{1}{2}$ , volume final 0,78 mL). Un logiciel permet l'acquisition et le traitement des données.

Bien que les résultats ne permettent que le calcul d'un pourcentage de réversibilité des plaquettes après un gonflement rapide dans un milieu de force ionique unique, ce test confirme l'interprétation de la variation de transmission lumineuse collimatée faite pour les mesures en dialyse lente.

Le gonflement osmotique engendre des réactions et des comportements de "lutte" ou d'adaptation de la structure plaquettaire vis à vis de l'influx d'eau (contraintes supérieures à celles rencontrées en condition physiologique). Ces notions sont en partie rassemblées dans le mécanisme dit de "régulation de volume".

Si maintenant l'observation du gonflement des plaquettes provoqué par une décroissance de la force ionique ne fait plus aucun doute, il reste nécessaire de se référencer aux travaux publiés afin d'essayer de se sensibiliser aux différents phénomènes interagissant pendant les mesures en dialyse lente, et d'approfondir l'interprétation de la variation lumineuse principalement après le cap des 100% de transmission : forme "ballonnée", lyse partielle ?

## 7. Etat et approfondissements de la question

Le Fragilimètre est destiné à la mesure de la résistance osmotique des éléments figurés du sang. La technologie a été choisie pour permettre de provoquer une variation de force ionique graduelle au niveau de l'échantillon tout en analysant la variation d'un faisceau lumineux. Ce dispositif favorise la caractérisation du comportement des membranes plasmiques pour des cellules aptes à gonfler. Dans cette étude, seules des analyses sur des plaquettes ont été effectuées.

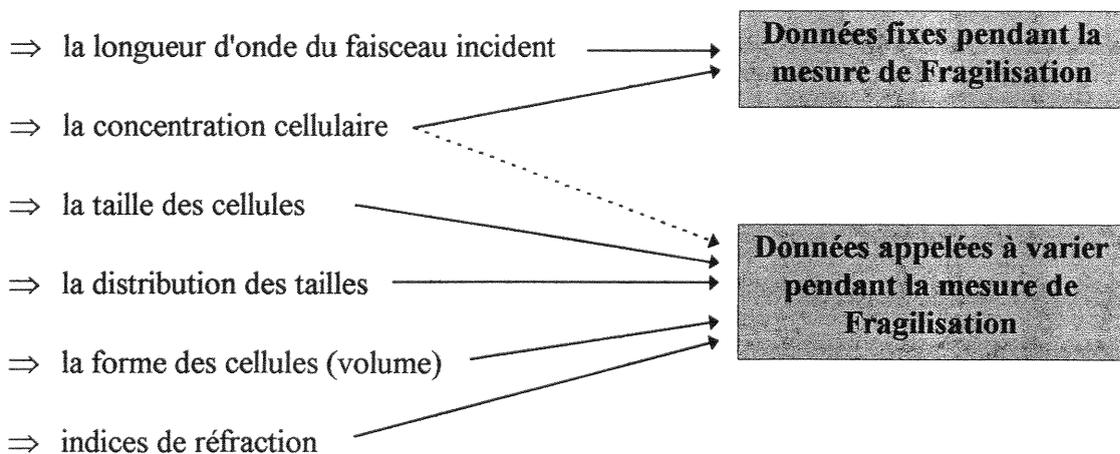
Les prédictions théoriques, complétées par quelques expérimentations sur des PRP ont permis de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu.

### Informations bibliographiques :

#### Variation d'intensité lumineuse à travers une suspension de plaquettes :

Les principaux résultats sont issus des travaux de Latimer (86-89), Holme (91), Arnaud (98), Frojmovic (99),.

*Les paramètres pouvant modifier l'intensité de diffusion lumineuse à travers une suspension de plaquettes sont :*



*Le principal paramètre pouvant modifier l'absorption lumineuse est :*



Les phénomènes physiologiques liés à la plaquette, modifiant l'intensité lumineuse pendant le test, sont regroupés sur la figure 41. Dans les conditions de mesure, la relation entre la théorie et les expérimentations est vérifiée.

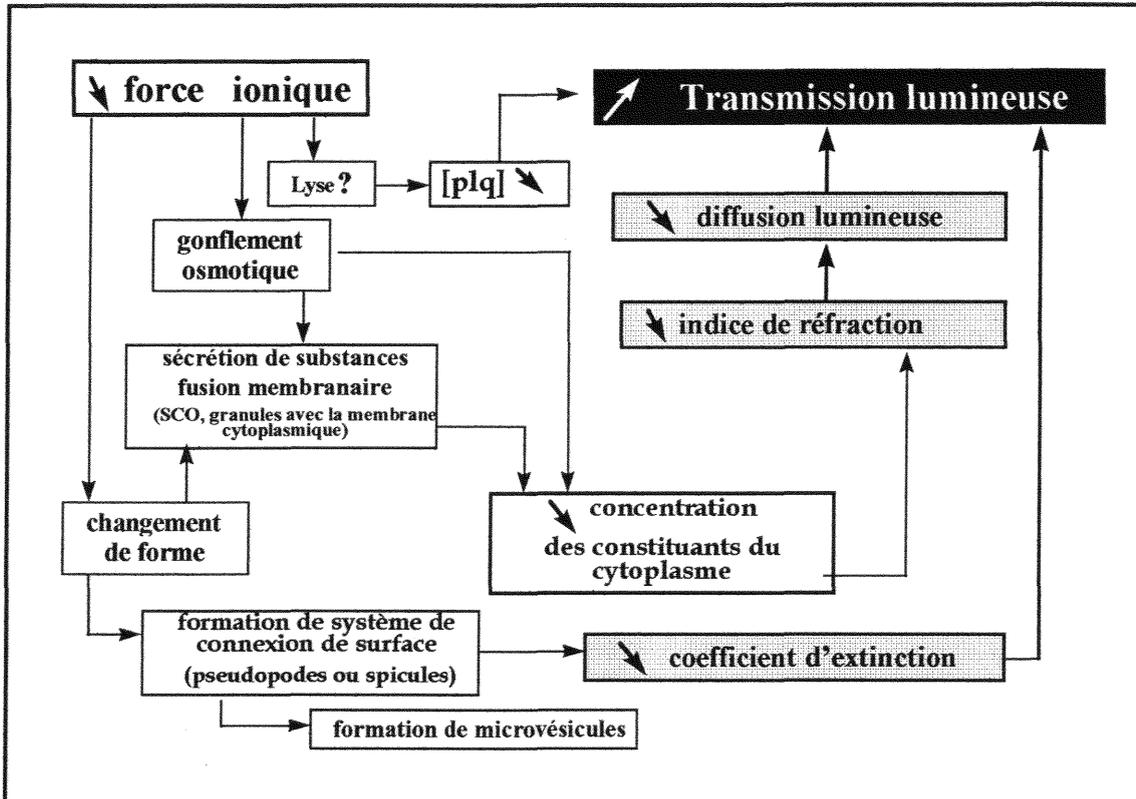


Figure 41 : synoptique des différents phénomènes influençant l'extinction du faisceau lumineux par une décroissance de la force ionique dans la suspension plaquettaire.

Tous les travaux cités ont confirmé que le gonflement osmotique engendre une augmentation de volume (mesuré par des compteurs cellulaires) en correspondance avec une diminution de la densité, de l'extinction et de l'indice de réfraction du milieu intracellulaire.

Le passage d'une forme discoïde à une forme sphérique et la formation de pseudopodes diminuent la diffusion lumineuse. L'influx d'eau dans la cellule, combiné à la sécrétion de certaines substances et à la fusion membranaire (apport de membrane cytoplasmique supplémentaire : Système Canaliculaire Ouvert et Système de tubulure dense) est certainement la source majeure du changement d'indice de réfraction intracellulaire. La densité des plaquettes s'en retrouve diminuée et favorise l'augmentation de transmission lumineuse par une diminution de la diffusion sur les plaquettes.

ARNAUD et coll en 1996 (98) en étudiant la viabilité des plaquettes cryoconservées par une mesure de transmission lumineuse conclu sur le fait que l'extinction d'un faisceau de lumière à travers un PRP ne reflète pas uniquement la taille des cellules, mais aussi la composition interne de cette population [l'auteur a conforté les travaux de Frojmovic et Wong (99)]. L'auteur a montré que les

mesures de transmission et le test de "score morphologique" sont corrélés, et que la transmission lumineuse reflète l'habileté des plaquettes à répondre aux différents environnements osmotiques.

**"régulation du volume" des plaquettes soumises à une contrainte osmotique :**

• ARMITAGE et coll. en 1985 (59), a étudié l'effet de la pression osmotique sur les plaquettes. Dans le cas d'un choc osmotique (test RCH), si les plaquettes ont une capacité réduite à réguler leur volume par un retour à une forme initiale (normale), c'est que la membrane des cellules a subi des dommages. Suivant le degré des lésions, ces détériorations membranaires seront considérées soit réversibles, soit irréversibles. L'auteur a calculé les limites physiques de gonflement pour des plaquettes sans aucune augmentation de la surface. (hypothèses : les plaquettes placées en condition d'isotonicité sont des sphéroïdes ovales, le mouvement de l'eau à travers la membrane plasmique est la seule cause du changement de volume).

$$V_{\text{(volume)}} = 4/3 \pi b^3 \cdot v \quad (1)$$

$$A_{\text{(surface)}} = (\pi/2)b^2 + [(1+v)/(1-v)] \log v^{-1} \quad (2)$$

(b : grand axe de l'ellipse et v : rapport des deux axes)

Les dimensions des deux axes sont calculées à partir de l'équation 1 en considérant que le volume moyen d'une plaquette normale est de 8,45  $\mu\text{m}^3$ . La surface est déterminée par l'équation 2, ce qui donne 25,5  $\mu\text{m}^2$ . Le volume d'une sphère ayant une surface de 25,5  $\mu\text{m}^2$  est de 12,11  $\mu\text{m}^3$ . Par conséquent, les plaquettes peuvent gonfler pour passer d'un volume de 8,45 à 12,11  $\mu\text{m}^3$  (soit 140% d'augmentation) sans aucune extension de leur surface membranaire. Le volume  $V_e$  occupé par l'eau active osmotiquement pour des plaquettes normales est de 5,71  $\mu\text{m}^3$ , ainsi le volume  $V_c$  des constituants non solubles est de 2,74  $\mu\text{m}^3$  (= 8,45 - 5,71). Si  $V_c$  reste constant pendant le gonflement, le volume d'eau dans la cellule passe de 5,71 à 9,37  $\mu\text{m}^3$  (soit 165%). Le volume d'eau osmotiquement actif dans la cellule est fonction de l'osmolarité extérieure, ainsi :

$$V_e / V_e^\circ = \Pi^\circ / \Pi$$

avec  $\Pi$  : pression osmotique (en osmol/kg, équivalent à un coefficient près à la force ionique) et l'annotation  $^\circ$  correspond aux valeurs normales (condition d'isotonicité, 0,31 osmol/kg soit 0,155 M pour les ions NaCl).

Par conséquent, pour provoquer une augmentation osmotique du volume d'eau intra-cellulaire de  $5,71$  à  $9,37 \mu\text{m}^3$ , une réduction de l'osmolarité de  $0,31$  à  $0,18$  osmol/kg est requise (soit une chute de la force ionique de  $0,155$  M à  $0,09$  M).

- MEYER et coll. en 1986 (100) et WONG et coll. en 1987 (101), ont étudié la diffusion de l'eau à travers la membrane des plaquettes en terme de perméabilité; cette perméabilité osmotique est différente de celle des érythrocytes (le coefficient de perméabilité osmotique  $P_f$  des plaquettes est quatre fois plus bas que celui des érythrocytes). Les différents paramètres sont calculés à partir de mesure par Résonance Magnétique Nucléaire. Les plaquettes ne semblent pas avoir un système de transport de l'eau spécialisé, mais plutôt un mécanisme de diffusion de l'eau à travers les phospholipides de la membrane.

- LIVNE et coll. en 1987 (102) a analysé la faculté des plaquettes humaines à réguler leur volume après un gonflement osmotique. Cette étude est basée sur un choc osmotique (test RCH). L'augmentation initiale de volume correspond au simple comportement osmotique avec un degré de gonflement qui croît en proportion inverse de la valeur de la force ionique. La deuxième phase qui conduit à un rétrécissement des plaquettes est induit par la diminution du volume régulé (DVR). La force mécanique du cytosquelette ne semble pas jouer un rôle prédominant. L'auteur associe le changement de volume à un gain ou une perte électrolytes. Le DVR implique une perte des ions  $\text{KCl}$  par les chemins de perméabilité pour les ions  $\text{K}^+$  et les anions, et probablement les ions  $\text{Cl}^-$ . En condition d'isotonie, la perméabilité des plaquettes aux ions  $\text{Cl}^-$  apparaît être plus petite comparée à celle des ions  $\text{K}^+$ . Après un gonflement hypotonique, les deux perméabilités augmentent (la perméabilité des ions  $\text{Cl}^-$  devient plus importante que celle des ions  $\text{K}^+$ ). Les chemins favorables aux ions  $\text{Cl}^-$  restent ouverts tant que les cellules sont gonflées. Le DVR est incomplet à moins que l'amiloride (un inhibiteur des échanges  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) ne soit présent ou que les ions  $\text{Na}^+$  ne soient remplacés par des cations imperméables.

- FROJMOVIC et coll. en 1992 (103) a confirmé que le gonflement osmotique peut doubler la surface de la membrane plasmique externe des plaquettes humaines normales (incubation de 1 ml de PRP avec 0,1 à 4 ml d'eau distillée, soit 20 à 90 % de dilution). Le système canaliculaire ouvert (SCO) est présenté comme la source principale de membrane supplémentaire. L'auteur a comparé le gonflement osmotique des plaquettes humaines par rapport aux plaquettes bovines qui elles ne possèdent pas de SCO. L'addition d'eau à du PRP a entraîné de façon séquentielle un changement de forme des cellules et la formation de sphérocytes osmotiques, analysés au cours du temps en

terme de modifications de taille et de surface à partir d'images de vidéomicroscopie à contraste de phase (fig 42). Les plaquettes sous forme discoïdale et sphérique, montrent que l'influx de l'eau peut amener à refouler le système canaliculaire en dehors de la membrane interne et sur la membrane externe. Ces mesures géométriques des discocytes et des sphérocytes osmotiques non lysés montrent une augmentation stable, maximale de  $2,1 \pm 0,1$  fois la surface de la membrane plasmique externe avec le gonflement osmotique, identique pour des plaquettes humaines normales de tailles différentes (volume moyen  $V= 2,8-6,8$  fL), pour les plaquettes anormalement grosses ( $V=8,7-11,6$  fL), ou pour les plaquettes de bœuf ou de lapin ( $V=3-4$  fL). Le gonflement osmotique semblant d'abord externaliser le SCO des plaquettes humaines, les quantités relatives identiques de membrane interne externalisées des plaquettes bovines pourraient venir d'un SCO de structure plus simple, osmotiquement plus labile, "fermé" ou d'une source de membrane distincte de celle des plaquettes humaines.

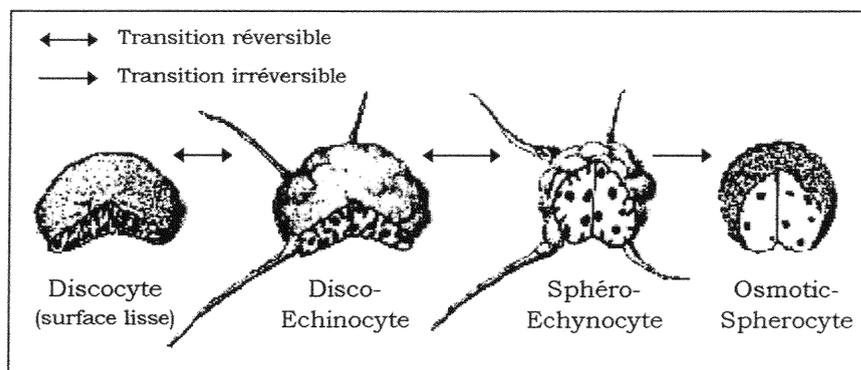


Figure 42 : modifications morphologiques des plaquettes soumises à une contrainte hypotonique croissante, d'après FROJMOVIC (103).

Les plaquettes de forme initiale discoïdale, inactivées et de surface lisse, se transforment en cellules "rugueuses" disco-échinocytes et sphéro-échinocytes, avec toutes deux des protubérances plates et des pseudopodes fins et longs. Ces deux transitions peuvent être réversibles. Le gonflement osmotique conduit pour une dilution du PRP supérieure à 60% avec de l'eau distillée ( $< 0,066$  M) à des sphérocytes osmotiques qui montrent une perte complète de toutes les invaginations et des SCO. Cet état est irréversible.

Ces travaux ont également montré, par une observation en microscopie électronique à transmission, qu'à partir d'une dilution de 80% ( $< 0,05$  M) une autre catégorie de cellules est dénombrée : les sphérocytes osmotiques "lysés".

- **DAVIS** et coll. en 1992 (62) a remarqué que les plaquettes ne sont pas uniquement capables de tolérer d'importants changements suivant l'hypotonicité, mais aussi de gonfler largement avant rupture. Pour une faible contrainte osmotique, les cellules sont capables de maintenir leur forme originale, en résistant à l'influx d'eau. Avec l'anticoagulant EDTA, le système canaliculaire est ouvert, d'où un gonflement plus rapide des plaquettes.

- **MARGALIT** et coll. en 1993 (104) a montré que les plaquettes humaines synthétisent et sécrètent l'Hepoxylin A<sub>3</sub> : des précurseurs endogènes en réponse au choc osmotique. Quand les plaquettes sont soumises à une contrainte hypotonique (test RCH), elles gonflent rapidement puis elles reviennent vers un volume d'origine ; ce processus peut être désigné comme "diminution de volume régulé" (DVR). La DVR est le résultat de l'augmentation de l'efflux d'ions K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>, associé à celui de l'eau; il est contrôlé par l'Hepoxylin A<sub>3</sub>. L'auteur en 1995 (105) a précisé son étude : Hepoxylin A<sub>3</sub> est un médiateur lipidique endogène qui s'oppose au gonflement osmotique des plaquettes humaines normales. Le rapport DVR calculé à partir de la mesure des modifications de volume en fonction du temps (Coulter Counter model ZM), est inférieur dans le cas de patients atteints d'Ischémie.

**En conclusion**, que ce soit un test par choc hypotonique ou un test par dialyse lente, la résistance osmotique des plaquettes peut être approchée, voire quantifiée. En effet, des modifications de la pression osmotique (suspension placée en hypotonicité) entraînent des changements morphologiques, principalement par un gonflement dû à un influx d'eau. Ces changements de forme et de volume sont limités par les caractéristiques de la membrane plasmique.

Pour le test RCH (chute limitée et instantanée de la force ionique), il semble que l'élasticité de la membrane plasmique autorise cette croissance de volume des plaquettes sans dommage. Ainsi, le système propre de régulation de volume permet aux plaquettes de retrouver une morphologie plus normale. Cette phase de réversibilité requiert de l'énergie et une certaine intégrité de la membrane. Le système d'autorégulation met en jeu des phénomènes d'échanges ioniques par une gestion sélective de la perméabilité de la membrane à certains ions, cations, ... . Le rôle du cytosquelette et des microtubules dans le maintien de la structure de base n'est certainement pas à négliger.

Pour les mesures de résistance osmotique par dialyse lente, les constatations précédentes restent vraies. Les plaquettes gonflent graduellement en relation avec la décroissance de la force ionique dans la suspension. Ces modifications géométriques dépendent de l'élasticité des membranes plaquettaires et du système de régulation de volume. Cette contrainte hypotonique appliquée permet aux plaquettes de mieux supporter l'influx d'eau et ainsi de gonfler plus largement. La dialyse permet d'atteindre des seuils en force ionique suffisamment bas (0,02M en 20 min) pour dépasser la limite critique de gonflement. L'apport de membrane supplémentaire associé à son élasticité ne permet pas aux plaquettes de gonfler infiniment. Deux solutions peuvent être avancées pour décrire la phase du gonflement critique :

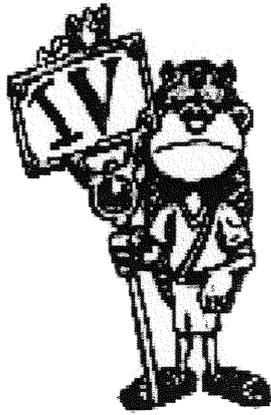
- soit le dépassement de ce seuil avec l'apparition d'une lyse, d'une rupture localisée de la membrane (formation de trous dans la membrane). Ces phénomènes permettraient un dégonflement par éjection du milieu intracellulaire.
- Soit l'intervention plus importante du système de régulation pour éviter cet état. Le contrôle de la perméabilité des électrolytes, permettrait de compenser l'excès de pression à l'intérieur des cellules.

Il sera intéressant de vérifier l'existence ou non et la possible influence du paramètre de vésiculation membranaire par émission de microparticules porteuses de phospholipides procoagulants exposés de manière irréversible.

Les premières expériences ont fourni des éléments de réponse. S'il est certain que la première phase de variation de transmission lumineuse à travers un PRP en dialyse, correspond à un gonflement des cellules (résistance osmotique), l'interprétation de la phase qui suit l'obtention des 100% de transmission ne peut être rigoureuse sans un approfondissement des recherches par des tests complémentaires (quantification de marqueurs de lyse par exemple). Le seuil de réversibilité semble être franchi pour les forces ioniques engendrées en fin de test. Les photos de microscopie électronique montrent l'allure des plaquettes pour une force ionique de 0,03 M, et l'aspect extérieur des cellules paraît privilégier la première hypothèse (forme ballonisée avec lyse partielle, et maintien de la structure). En fin de mesure (0,02 M), la fragilisation des plaquettes préparées à partir de sang total prélevé sur citrate semble entraîner une agrégation spontanée, probablement liée à la sécrétion et la lyse des facteurs correspondants.

Il est à considérer d'après ces analyses qu'un déplacement des courbes, obtenues en mesure de résistance osmotique plaquettaire par dialyse lente, vers la gauche sera synonyme d'un gonflement plus rapide des cellules. Les différents seuils de transmission (0, 25, 50, 75%) seront atteints plus tôt en temps et donc pour des forces ioniques plus élevées. Cette caractéristique se traduira par une résistance osmotique plus faible.

Le bilan de cette étude préliminaire, montre la corrélation entre les paramètres calculés par le Fragilimètre et le comportement osmotique des plaquettes. Il autorise la mise en place de protocole d'étude de caractérisation de la résistance osmotique des plaquettes dans différentes conditions hématologiques.



*Etudes menées,  
Statistiques,  
Résultats*

## 1. INTRODUCTION

La première étape d'évaluation technologique et biologique a permis de vérifier que le dispositif de mesure proposé fournit des caractéristiques de la résistance osmotique des plaquettes. Il s'agit à présent de mieux quantifier le phénomène observé, d'interpréter les résultats et de mieux définir les conditions d'analyse. Le but reste l'obtention de résultats significatifs du phénomène étudié pour permettre la validation du test.

Différentes séries de mesures ont été réalisées afin d'évaluer la reproductibilité et la sensibilité de cette nouvelle méthode en fonction de divers paramètres expérimentaux :

- influence de l'anticoagulant (EDTA, citrate) sur le comportement osmotique des plaquettes, avec une analyse des amplitudes et des seuils de transmission lumineuse,
- influence de la concentration cellulaire sur les résultats,
- influence de la température de mesure sur la résistance osmotique des plaquettes,
- "références physiologiques".

Une étude de la résistance osmotique des plaquettes de patients hémodialysés a été réalisée. Les mesures de fragilité ont été effectuées à partir de prélèvement sanguin avant et après traitement. L'objectif est d'apprécier si la procédure de dialyse provoque une fragilisation des plaquettes.

Suite à ces séries d'expériences, l'application de ce test au suivi de la conservation de concentrés plaquettaires sera abordée. La résistance osmotique est avant tout un test *in vitro* fournissant des critères de viabilité cellulaire. Ce test est donc appelé à être utilisé pour le contrôle de qualité des concentrés plaquettaires conservés avant transfusion. Le test pratiqué sur le Fragilimètre permettra également d'optimiser et de vérifier l'incidence de chaque paramètre intervenant entre la préparation des poches et la transfusion sur des malades (séparateurs, critères de conservation,...).

Trois protocoles ont été réalisés (cf tab VI):

- une série de mesures à  $j=0$  pour caractériser l'influence de la technologie de séparation sur la viabilité des plaquettes ;
- une série de mesures à  $j=0$ ,  $j=2$  ou  $j=3$ ,  $j=5$  et  $j=6$  pour évaluer la viabilité de concentrés préparés de façon standard (CSP) et de concentrés préparés par aphérèse (CPA) sur quatre séparateurs différents en fonction du temps de conservation. Ce protocole a été couplé à une analyse de l'activation par la quantification des glycoprotéines membranaires et à une numération sur un automate de comptage (Technicon-H2 système Bayer).
- une série de mesures à  $j=0$ ,  $j=2$  ou  $j=3$  et  $j=5$  pour évaluer la viabilité de concentrés préparés uniquement par le séparateur Amicus (nombre de point de poncture différent que sur le séparateur Amicus du protocole précédent), dans le cadre d'un protocole demandé par le service de cytophérèse de l'établissement de transfusion de Nancy Brabois, englobant d'autres tests (glycoprotéines, Béta-thromboglobuline, numération, ...).

Remarque : Chaque évaluation de la résistance osmotique pour un même échantillon a porté systématiquement et au minimum sur deux mesures consécutives. Cette procédure a permis une validation et une optimisation des résultats.

De plus, pour chaque indice caractérisant la résistance osmotique des plaquettes (seuil 2, 25, 50, 75, 100% de transmission exprimées en force ionique), la diminution de la résistance osmotique correspondra à une augmentation de la valeur. Inversement, par analogie aux érythrocytes, l'augmentation de leur valeur signifiera une diminution de la résistance osmotique, ce qui équivaut à une fragilité des plaquettes plus importante et finalement à une viabilité amoindrie.

Pour les courbes de transmission lumineuse, exprimées entre 0 et 100 % de la pleine échelle, en fonction de la force ionique : un décalage vers la gauche des courbes sera interpréter comme une diminution de la résistance osmotique.

## 2. INFLUENCE DE L'ANTICOAGULANT

Deux séries de mesures de 20 témoins ont permis de tester l'influence de l'anticoagulant. Les courbes enveloppes pour chaque anticoagulant sont définies à partir du calcul des moyennes  $\pm$   $\sigma$  (écart type) de la variation de lumière transmise en fonction de la force ionique (fig. 43).

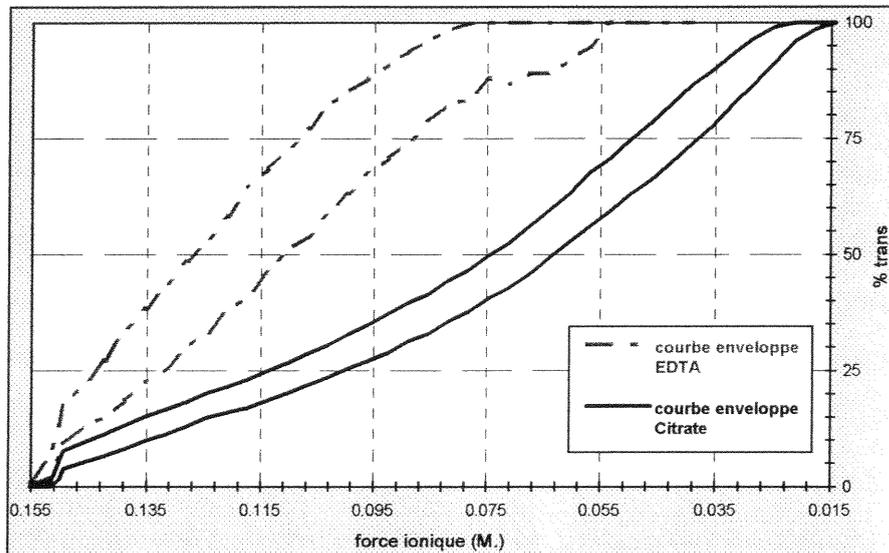


Figure 43 : représentation des courbes enveloppes (moyenne  $\pm$  écart type :  $\sigma$ ) du signal de transmission en fonction de la force ionique pour 20 PRP témoins issus de sang total prélevé sur EDTA et 20 PRP témoins issus de sang total prélevé sur citrate.

Les concentrations sont voisines de  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L.

Une comparaison des seuils initiaux de transmission ainsi que des amplitudes a été réalisée pour des plaquettes d'un même donneur issues de sang total prélevé sur EDTA et citrate (PRP ajusté à une concentration identique de  $430 \cdot 10^9$  plaquettes/L).

Les mesures de transmission lumineuse ont été effectuées à travers différentes suspensions de  $160 \mu\text{L}$  placées dans le porte échantillon :

- eau distillée (solution identique dans la cuve et le porte échantillon),
- solution saline isotonique à  $0,155 \text{ M}$  avec dialyse contre l'eau distillée,
- PPP issu de sang total prélevé sur EDTA avec dialyse contre l'eau distillée,
- PRP issu de sang total prélevé sur EDTA avec dialyse contre l'eau distillée,
- PRP issu de sang total prélevé sur EDTA avec dialyse contre une solution saline de NaCl à  $0,0775 \text{ M}$ ,

- PPP issu de sang total prélevé sur citrate avec dialyse contre l'eau distillée,
- PRP issu de sang total prélevé sur citrate avec dialyse contre l'eau distillée,
- PRP issu de sang total prélevé sur citrate avec dialyse contre une solution saline de NaCl à 0,0775 M.

Les résultats, illustrés par les courbes de la figure 44, permettent de constater que :

- les intensités lumineuses de transmission à travers l'eau distillée et la solution isotonique sont identiques (seuil stable et égal à environ 3080 en unités arbitraires),
- les intensités lumineuses de transmission à travers les deux PPP sont quasi identiques et proche de 3000 (le PPP issu de sang total prélevé sur EDTA montre une légère chute d'intensité, phénomène indépendant des conditions de mesure, car d'autres tests ont montré une stabilité reproductible),
- les intensités de transmission initiale à travers les PRP sont identiques pour le même anticoagulant quelle que soit la solution dans la cuve de 90 mL. Ces seuils sont différents suivant l'anticoagulant utilisé,
- l'amplitude de la courbe pour le PRP issu de sang total prélevé sur citrate est plus importante que celle pour le PRP issu de sang total prélevé sur EDTA,
- chaque courbe correspondant aux mesures à travers les PRP, pour une dialyse contre l'eau distillée, atteint un plateau. Ce stade final est obtenu à des temps différents.
- chaque courbe correspondant aux mesures à travers les PRP, pour une dialyse contre une solution saline de NaCl à 0,0775 M, révèle une augmentation de la transmission suivie d'une extinction progressive du faisceau lumineux (le signal converge vers les seuils initiaux respectifs).

Ces résultats permettent de vérifier que l'extinction du faisceau lumineux à travers un PPP, pour la longueur d'onde utilisée, est faible et constante durant la mesure. L'intensité lumineuse augmente au cours du temps pour les tests classiques et se rapproche du seuil obtenu pour un PPP. Les seuils initiaux de transmission sont caractéristiques de la morphologie initiale des plaquettes (sur EDTA, les plaquettes sont légèrement gonflées). Ces

données sont corrélées par les différences d'amplitude sachant que les intensités maximales pour les deux anticoagulants sont très proches.

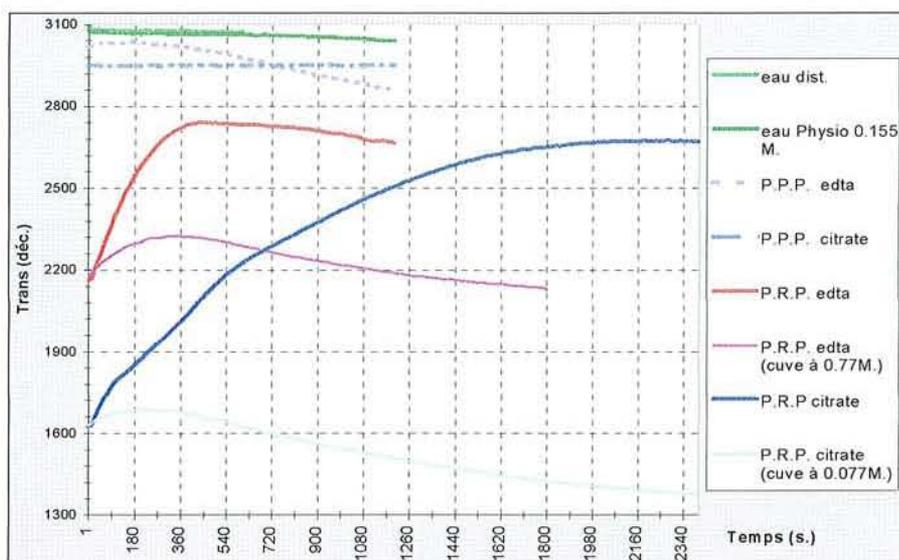


Figure 44 : courbes de transmission lumineuse en fonction du temps obtenues pour des plaquettes d'un même donneur issu de sang total prélevé sur EDTA et citrate (PRP ajustés à la même concentration  $430.10^9$  plaquettes/L). Caractérisation des amplitudes et des différents seuils de transmission.

La différence quant aux résultats obtenus suivant l'anticoagulant utilisé est significative. Les courbes enveloppes (fig 43) sont très distinctes.

De par sa capacité à maintenir une meilleure intégrité cellulaire, et par la reproductibilité des valeurs obtenues (coefficient de variation plus faible pour le citrate, que pour l'EDTA), le citrate a été retenu comme anticoagulant de référence pour la suite du travail.

### 3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION PLAQUETTAIRE

L'influence de la concentration cellulaire sur la mesure de la résistance osmotique a été étudiée à partir de cinq prélèvements de sang provenant de sujets sains (chaque PRP préparé a été ajusté avec du plasma autologue (PPP) à différentes concentrations de  $150.10^9$  à  $500.10^9$  plaquettes/L, anticoagulant citrate) (fig. 45).

Les courbes obtenues (avec une échelle de valeur arbitraire en fonction de la force ionique) montrent une différence d'amplitude entre les différents signaux recueillis.

Ainsi, l'amplitude de la variation d'intensité lumineuse captée pendant une mesure et le seuil initial de transmission sont en relation de proportionnalité avec la concentration cellulaire.

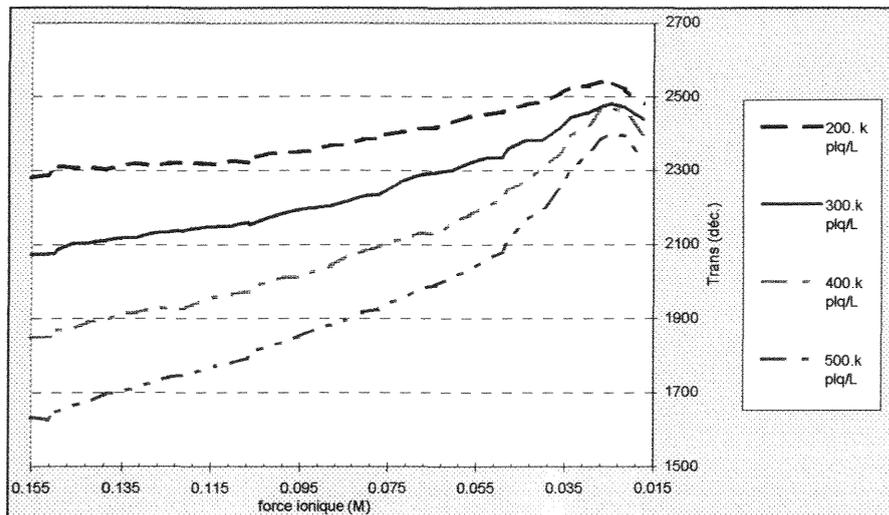


Figure 45 : variations relatives de transmission lumineuse en fonction de la force ionique (pour un même échantillon) avec différentes concentrations cellulaires (plq = plaquettes et  $k = 10^9$ ).

Ces courbes recalculées avec une échelle relative 0-100% (cf fig 18) en fonction de la force ionique montrent une superposition des résultats quelle que soit la numération (fig 46). L'analyse des résultats précise cependant qu'une concentration minimale de  $100 \cdot 10^9$  à  $150 \cdot 10^9$  cellules/L est à respecter pour une interprétation fiable des mesures (en fait, pour un rapport signal / bruit optimal).

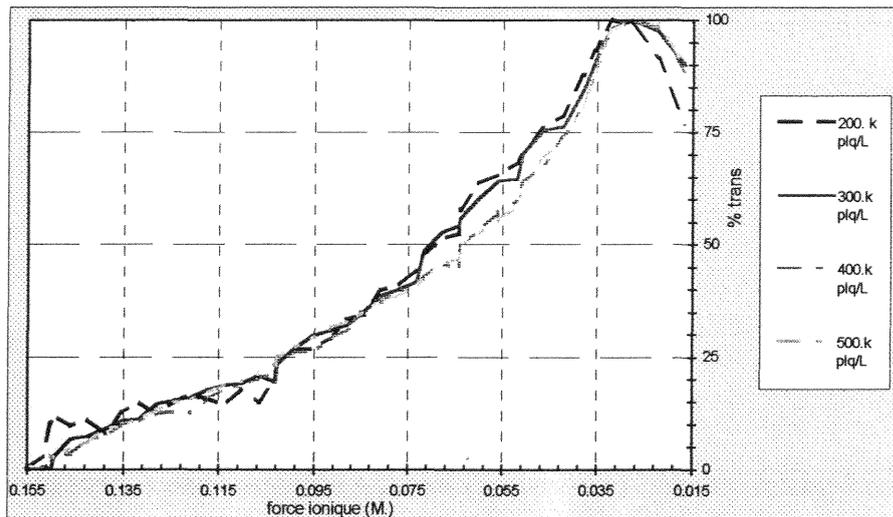


Figure 46 : variations relatives de transmission lumineuse en fonction de la force ionique (pour un même échantillon) pour différentes concentrations cellulaires (plq : plaquettes,  $k = 10^9$ ).

Ce test simple permet de montrer que la concentration cellulaire, en respectant la plage donnée, n'influence pas significativement les résultats de la résistance osmotique fournis par le Fragilimètre.

#### 4. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE DE MESURE

Plusieurs séries de mesures de résistance osmotique ont été réalisées pour 6 PRP témoins (anticoagulant citrate,  $300.10^9$  plaquettes/L) en fonction de la température des 90 mL d'eau distillée de la cuve. Chaque série (même PRP) correspond à 2 mesures sur 20 minutes à une température de  $37^\circ\text{C}$  (classique) et à 2 mesures sur 20 minutes à une température de  $25^\circ\text{C}$  (température ambiante).

Remarque : pour chaque température de consigne choisie, un étalonnage des seuils de conductance est pratiqué.

Les résultats pour une série choisie comme exemple sont illustrés sur la figure 47. Chaque courbe de transmission lumineuse, exprimée entre 0 et 100% de la pleine échelle, correspond à la moyenne des deux mesures effectuées pour une même température de consigne.

Un déplacement vers la droite de la courbe pour une température de  $25^\circ\text{C}$  est observé. Les plaquettes semblent gonfler plus lentement pour cette température. La résistance osmotique est donc plus efficace. Parallèlement, les plaquettes sont osmotiquement plus "fragiles" à  $37^\circ\text{C}$ .

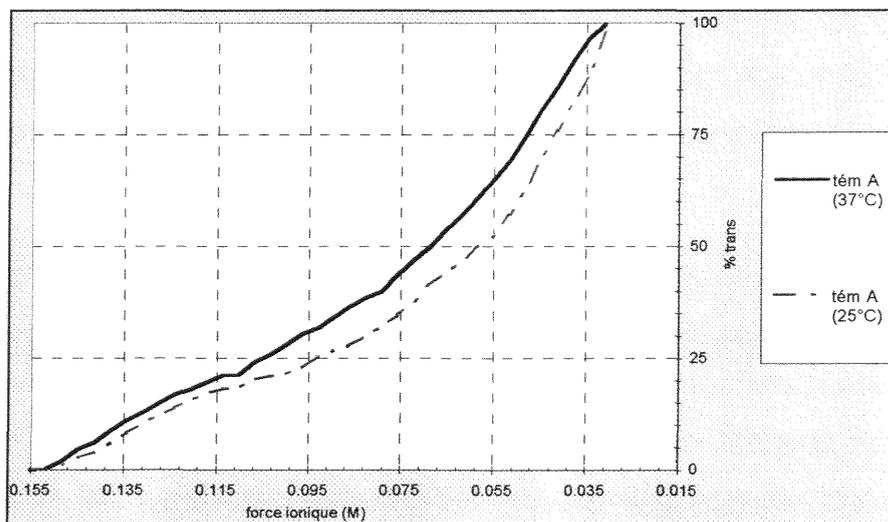


Figure 47 : courbes de transmission lumineuse, exprimées entre 0 et 100 % de la pleine échelle en fonction de la force ionique, pour le même PRP témoin (anticoagulant citrate,  $300.10^9$  plaquettes/L) à deux températures de mesures différentes (25 et  $37^\circ\text{C}$ ).

Afin de vérifier et de compléter l'analyse de l'influence de la température sur la mesure, des tests ont été réalisés en plaçant l'appareil en chambre froide. Cette méthode permet d'atteindre une température stable et voisine des 8 à  $10^\circ\text{C}$  au niveau de l'eau distillée dans la cuve. Les résultats donnés (fig 48) sont conformes aux quelques tests réalisés (limités par la complexité de mise en œuvre). Cette expérience est effectuée sur des PRP issu de sang total prélevé sur l'anticoagulant EDTA

afin de minimiser les temps de mesure et de respecter les conditions d'analyses (l'ensemble des mesures devant être réalisé dans un délai de trois heures après le prélèvement sanguin).

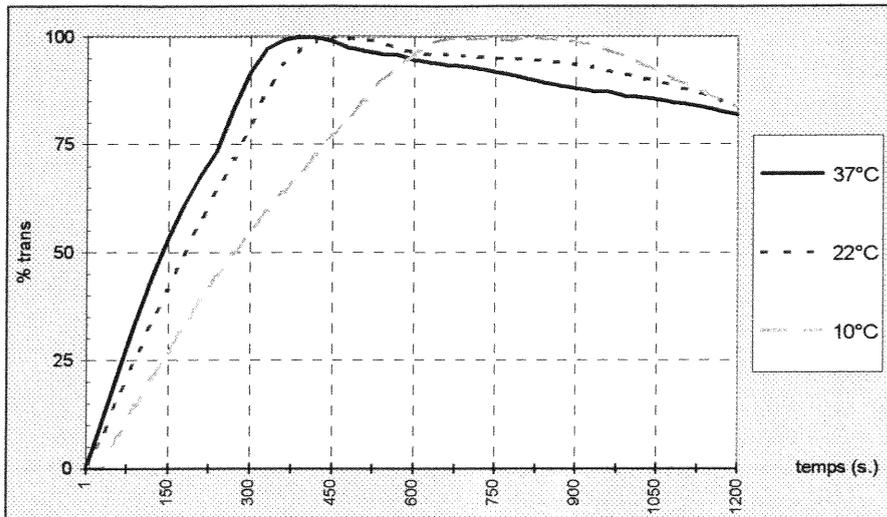


Figure 48 : courbes représentatives des valeurs de transmission lumineuse en fonction du temps, caractéristiques de la résistance osmotique plaquettaire d'un même PRP pour 3 températures différentes (10, 22, 37°C).

Le décalage des courbes vers la droite, lié à la baisse de la température de mesure, semble montrer une augmentation de la résistance. Les plaquettes étudiées à 10°C semblent donc moins fragiles osmotiquement. Les valeurs de transmission exprimées entre 0 et 100% sont tracées en fonction du temps car pour chaque température de mesure le signal de conductance est différent.

## **5. CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES : fiabilité, sensibilité, reproductibilité**

L'analyse intra-témoin correspondant à six mesures consécutives sur le même PRP issu de sang total prélevé sur citrate, montre une bonne reproductibilité (test effectué à partir de 16 donneurs). Les écarts types calculés à partir des six courbes de transmission en fonction de la force ionique en NaCl pour un même témoin restent inférieurs à 0,005 M soit un CV de 3.2% (exemple pour le seuil de 50 % de transmission, fig 49). Aucune dérive n'a été observée au cours des six mesures réalisées, sur une période de trois heures, avec le même PRP conservé à température ambiante. Si la reproductibilité est satisfaisante, il reste à constater une variation des indices plus marquée entre les différents donneurs. Ce dernier aspect permet d'approcher la notion de sensibilité du test. Chaque PRP témoin semble posséder ses caractéristiques propres de résistance osmotique plaquettaire (moyennes sensiblement dispersées, les écarts types sont inférieurs aux écarts entre ces moyennes).

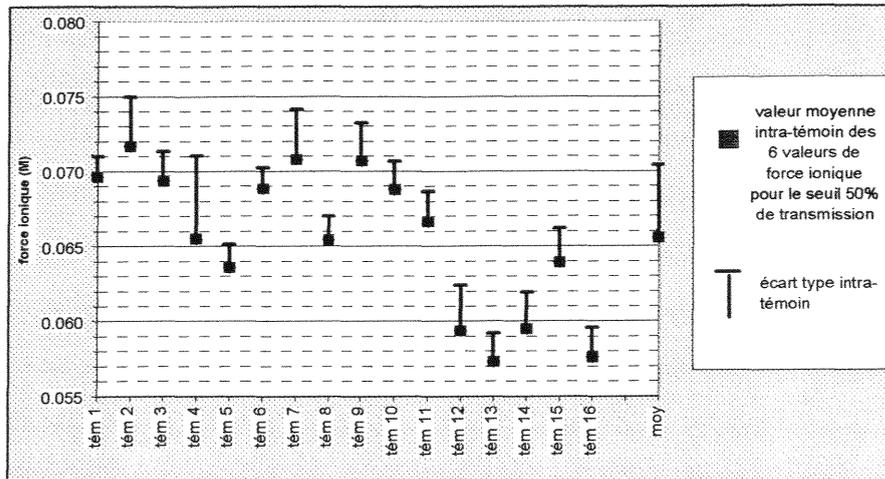


Figure 49 : valeurs moyennes et  $\sigma$  intra donneurs correspondant aux forces ioniques pour le seuil de 50% de transmission (6 mesures consécutives pour 16 donneurs différents)

Tableau IX : Valeurs des indices moyens caractéristiques de la résistance osmotique pour des PRP issu de sang total prélevé sur l'anticoagulant citrate (N=96).

Indices	pente init-25%	pente 25-50%	pente 50-75%	trans 2% M	trans 25% M	trans 50% M	trans 75% M	trans 98% M
moyenne	-0.137	-0.196	-0.299	0.149	0.101	0.065	0.039	0.020
Ecart type	0.023	0.021	0.044	0.002	0.0066	0.0058	0.0059	0.0036
Coef Var.	16.6	10.5	14.6	1.5	6.5	8.9	15.0	18.4

Toutes ces valeurs sont calculées à partir des courbes d'intensité lumineuse captée en fonction de la force ionique.

La fiabilité de la méthode a été évaluée sur une série de 96 mesures (32 PRP témoins prélevés sur citrate). Les courbes enveloppes moyennes (fig. 50) correspondant à la transmission moyenne  $\pm \sigma$  peuvent servir de référence physiologique. Le tableau IX définit les indices caractéristiques de la résistance osmotique pour ces statistiques sur 96 mesures.

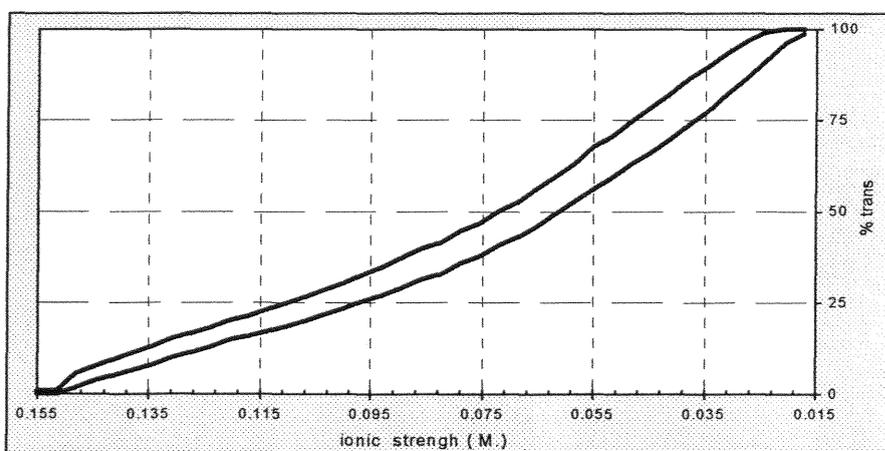


Figure 50 : courbes enveloppes moyennes de la fragilité plaquettaire correspondant à 96 mesures sur des PRP de donneurs sains. (courbes construites à partir de la courbe moyenne des 96 mesures  $\pm \sigma$ ).

## 6. INFLUENCE DE LA PROCEDURE DE TRAITEMENT DES DIALYSES SUR LA RESISTANCE OSMOTIQUE DES PLAQUETTES

La possibilité de s'inclure dans un protocole d'étude concernant l'incidence du traitement proposé au dialysé a permis d'appliquer le test de résistance osmotique plaquettaire. L'étude, effectuée sur 12 patients, a été réalisée à partir d'un prélèvement sanguin avant et après hémodialyse, sur des tubes citratés de 4 mL.

Les 12 fiches de résultats sont illustrées sur la figure 51 (pour chaque patient, un graphique présente les courbes de transmission exprimées entre 0 et 100% de la pleine échelle caractérisant la réponse osmotique des plaquettes avant et après traitement, ainsi que la courbe enveloppe utilisée comme "référence physiologique", définie précédemment). En première analyse, la résistance osmotique des plaquettes est plus faible après dialyse. Chaque dialysé semble présenter des caractéristiques propres quant à l'allure des courbes.

La figure 52 permet de visualiser les valeurs moyennes des indices choisis pour caractériser la résistance osmotique des plaquettes, exprimées en unité de force ionique (M). Pour chacun de ces seuils, les moyennes calculées pour les 12 patients montrent :

- qu'avant dialyse, les valeurs sont dans la plage de "référence physiologique" calculée précédemment,
- qu'après dialyse, les valeurs sont supérieures à la limite haute de ces mêmes "références physiologiques"

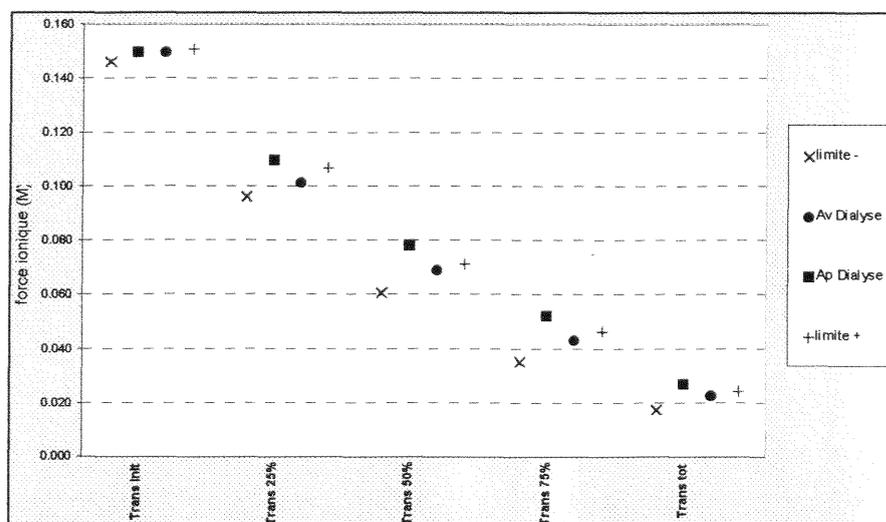


Figure 52 : valeurs moyennes, exprimées en unité de la force ionique, des indices caractéristiques de la résistance osmotique des plaquettes avant et après dialyse des patients. (les valeurs notées limite - et limite + correspondent aux valeurs de la courbe enveloppe "référence physiologique").

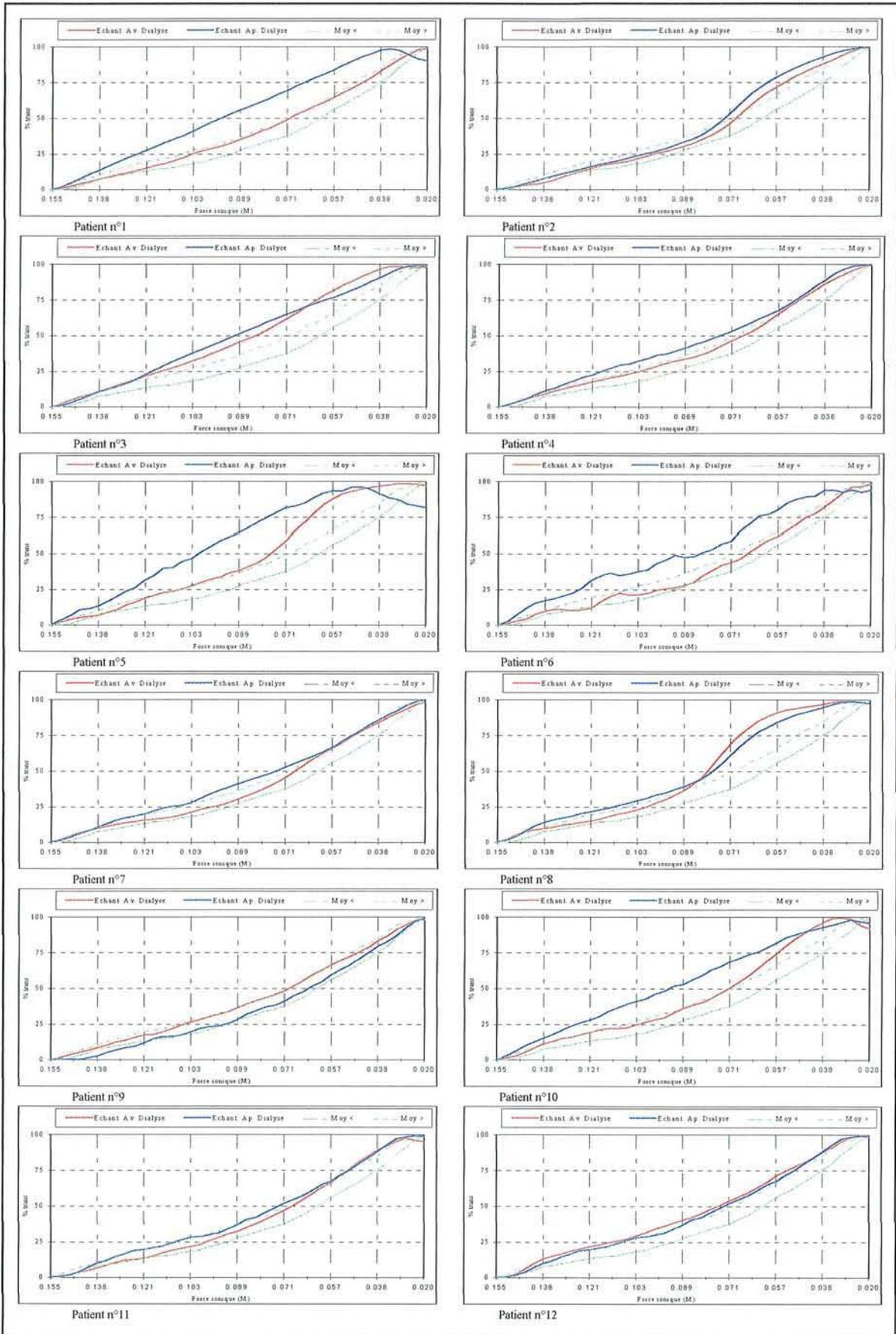


Figure 51 : résultats du protocole sur les patients dialysés en terme de résistance osmotique des plaquettes avant et après traitement.

## 7. EVALUATION DE L'INFLUENCE DE LA TECHNIQUE DE SEPARATION SUR LA VIABILITE DES CONCENTRES PLAQUETTAIRES AU PREMIER JOUR DU PRELEVEMENT

La principale application du test de résistance osmotique plaquettaire s'adresse au suivi de la viabilité des plaquettes. Une évaluation de la qualité des concentrés plaquettaires à j=0 (jour du prélèvement) obtenus à partir de quatre séparateurs a permis une distinction en terme de résistance osmotique (fig 53). Les plaquettes isolées à partir du séparateur Amicus montre une résistance osmotique plus faible et des écart-types plus importants (tab X), principalement par rapport aux résultats obtenus avec le séparateur Cobe (les résultats pour les séparateurs MCS et FRES sont proches et compris entre ceux des deux autres séparateurs). La technologie de séparation semble donc importante quant à la fragilisation des plaquettes.

Tableau X : Résistance osmotique à j=0 des concentrés.

Type de séparateur	échantillons testés (N)	25% trans			50% trans			75% trans		
		moyenne Molaire	Ec Molaire	Coef. var. %	moyenne Molaire	Ec Molaire	Coef. var. %	moyenne Molaire	Ec Molaire	Coef. var. %
AMICUS	12	0.106	0.012	11.32	0.07	0.013	18.57	0.033	0.009	27.27
MCS	12	0.092	0.008	8.70	0.053	0.006	11.32	0.027	0.005	18.52
FRES	6	0.09	0.004	4.44	0.057	0.006	10.53	0.031	0.005	16.13
COBE	12	0.087	0.006	6.90	0.047	0.005	10.64	0.023	0.003	13.04

Valeurs moyennes des forces ioniques (en M) correspondant aux seuils de transmission de 25, 50 et 75%, pour les concentrés préparés par quatre séparateurs différents. Les écart-types (Ec) et les coefficients de variation (CV) sont donnés

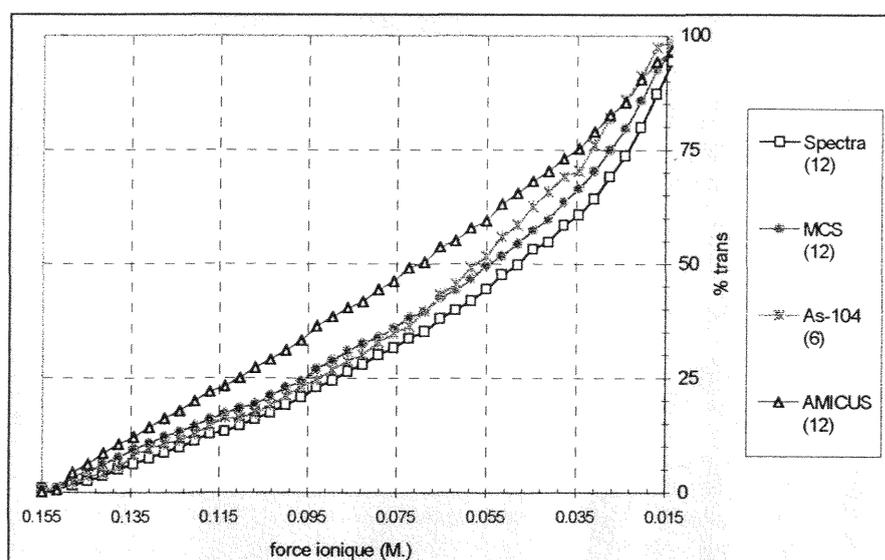


Figure 53 : courbes moyennes de transmission ramenées entre 0 et 100% en fonction de la force ionique, obtenues pour chaque séparateur (étude à j=0).

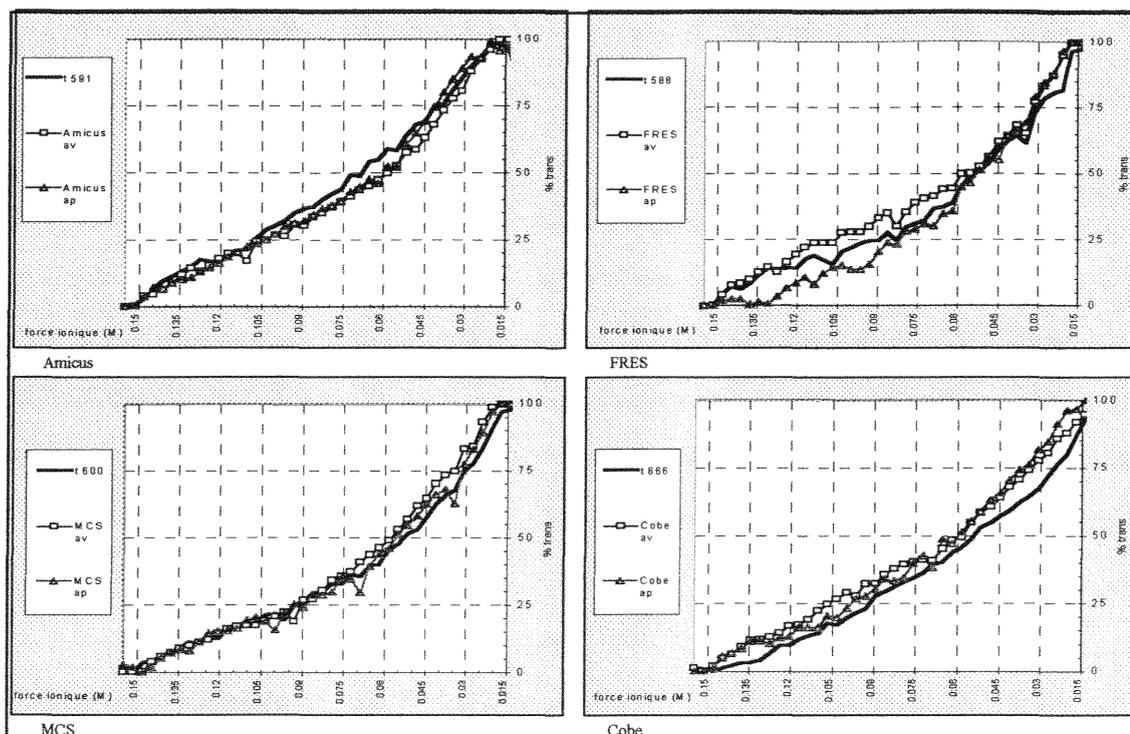


Figure 54 : courbes de transmission lumineuse, exprimée entre 0 et 100% de la pleine échelle, en fonction de la force ionique, protocole d'étude des concentrés plaquettaires au premier jour.

Par graphique (un par séparateur) sont représentées la courbe correspondant au concentré plaquettaire préparé par un type de machine et les courbes correspondant au PRP du même donneur, mais préparés à partir d'un prélèvement sur sang total (anticoagulant citrate) avant et après la procédure d'aphérèse.

A ce protocole est ajoutée une analyse de la résistance osmotique plaquettaire pour des mêmes donneurs à partir de trois prélèvements différents :

- 1 tube (sec) de concentré plaquettaire prélevé sur la poche préparée sur un type de machine (mesure effectuée après dilution du concentré avec du plasma autologue pour obtenir une concentration proche de  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L),
- 1 tube citraté de sang total prélevé avant la procédure d'aphérèse (préparation d'un PRP avec ajustement de la concentration à environ  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L),
- 1 tube citraté de sang total prélevé après la procédure d'aphérèse (même préparation que ci-dessus).

Les courbes obtenues (fig 55), montrent des résultats quasi identiques pour les mesures effectuées sur des plaquettes issues d'un prélèvement sur sang total avant et après la procédure d'aphérèse. Des comparaisons entre ces deux courbes et celles concernant les plaquettes préparées avec les quatre séparateurs cellulaires sont réalisées. Le séparateur Amicus semble fournir des cellules plus fragiles (fig 53). Le séparateur Cobe semble lui préparer des concentrés de plaquettes osmotiquement plus résistantes. Les deux autres séparateurs semblent donner les résultats les plus satisfaisants (La machine MCS semblant être la plus performante quant aux différences entre la résistance osmotique des plaquettes obtenues suivant les deux techniques).

## **8. EVALUATION DE LA VIABILITE DE CONCENTRES PLAQUETTAIRES PREPARES DIFFEREMMENT, AU COURS DE LA CONSERVATION SUR 6 JOURS**

Le suivi sur six jours de la fragilité osmotique de concentrés plaquettaires, préparés avec trois séparateurs (cf tab VII) et par centrifugation à partir de prélèvement de sang total, a été également réalisé. Cette étude porte sur une évaluation aux jours  $j=0$ ,  $j=2$  ou  $j=3$ ,  $j=5$  et  $j=6$  de la résistance osmotique plaquettaire, des résultats de la numération et du taux d'activation (quantification par immunofluorescence des glycoprotéines membranaires).

### **8.1. Résistance osmotique**

Le tableau XI résume les indices les plus significatifs. Les différentes numérations restent relativement identiques suivant le temps de conservation pour chaque poche et donc pour la moyenne des numérations par type de poche. Cette réflexion est également applicable pour le volume plaquettaire moyen (VPM). Quant aux indices représentatifs de la résistance osmotique, ils évoluent et montrent une fragilisation accrue des plaquettes suivant le délai de conservation.

Les courbes de transmission lumineuse exprimées entre 0 et 100% de la pleine échelle en fonction de la force ionique (fig 55) confirment la diminution de la résistance osmotique (décalage des courbes vers la gauche) pour chaque catégorie de poche, alors qu'il n'est pas observé de variation de la numération et du volume moyen pendant la conservation. Par contre, l'amplitude du signal lumineux mesuré à travers le PRP dans le "Fragilimètre" décroît en fonction des jours de conservation.

Pour approfondir l'interprétation des résultats tout en limitant le nombre des illustrations, les valeurs de forces ioniques correspondant au seuil de 50% de transmission sont retenues et permettent une interprétation différente en fonction des jours de conservation et en fonction de la technique de préparation des concentrés.

Tableau XI : indices retenus pour l'analyse du suivi de la viabilité de concentrés plaquettaires préparés différemment en fonction des jours de conservation.

type de concentrés		J = 0	J = 2 ou 3	J = 5	J = 6
CSP N = 5	Num (plaq/mm3)	1252	1206	1191	1276
	VPM (fL)	6.28	5.88	5.90	5.93
	Ampl. S. Trans.	1143	855	727	554
	25 % (M)	0.0645	0.0658	0.0808	0.0803
	50 % (M)	0.0292	0.0342	0.0483	0.0461
	75 % (M)	0.0176	0.0208	0.0242	0.0287
CPA DIDECO N = 5	Num (plaq/mm3)	1242	1296	1313	1183
	VGM	6.88	7.05	6.33	6.07
	Ampl. S. Trans.	1115	955	943	859
	25 % (M)	0.0765	0.0780	0.0841	0.0754
	50 % (M)	0.0448	0.0517	0.0593	0.0468
	75 % (M)	0.0247	0.0338	0.0445	0.0310
CPA COBE N = 5	Num (plaq/mm3)	1514	1444	1479	1473
	VGM	6.77	5.93	6.00	6.20
	Ampl. S. Trans.	1432	1300	1123	1130
	25 % (M)	0.0711	0.0690	0.0912	0.0990
	50 % (M)	0.0340	0.0348	0.0508	0.0592
	75 % (M)	0.0228	0.0236	0.0275	0.0304
CPA MCS N = 5	Num (plaq/mm3)	1355	1301	1340	1265
	VGM	8.08	6.75	6.88	6.77
	Ampl. S. Trans.	1019	859	674	770
	25 % (M)	0.0622	0.0740	0.0824	0.0847
	50 % (M)	0.0307	0.0385	0.0443	0.0581
	75 % (M)	0.0221	0.0173	0.0233	0.0336

CPA : concentrés plaquettaires préparés en aphasère

CSP : concentrés standards de plaquettes (préparés à partir d'un prélèvement de sang total par centrifugation)

Num : numération plaquettaire exprimée en nombre de cellule par unité de volume ( $10^9 / L$ ).

VPM : volume plaquettaire moyen exprimé en fL.

Ampl S. Trans : amplitude en valeur arbitraire du signal lumineux recueilli.

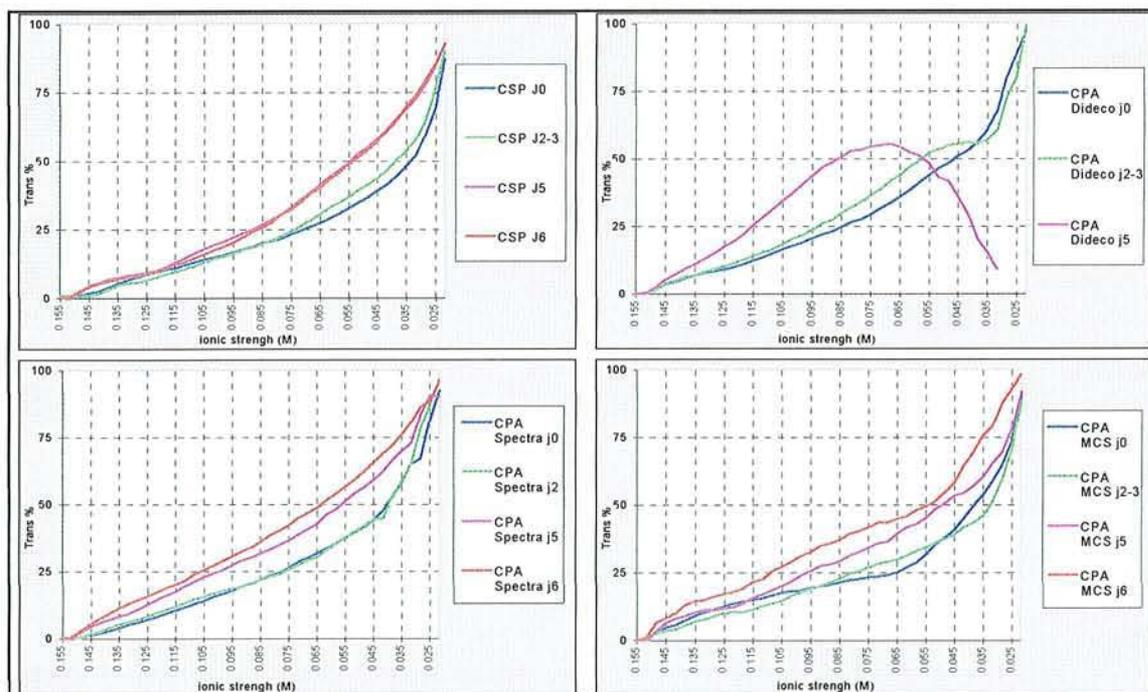


Figure 55 : courbes moyennes de transmission ramenées entre 0 et 100% en fonction de la force ionique, obtenues pour les concentrés plaquettaires, préparés suivant 4 techniques, à j=0, j=2 ou j=3, j=5 et j=6.

La figure 56 permet une comparaison rapide de l'influence des séparateurs sur la viabilité potentielle des plaquettes en fonction des jours. Les variations de cet indice (50% de transmission lumineuse) entre le jour 0 et le jour 2 (ou 3) comparées à celles entre le jour 2 (ou 3) et le jour 5 permettent un suivi de l'évolution de la viabilité des plaquettes sur 5 jours.

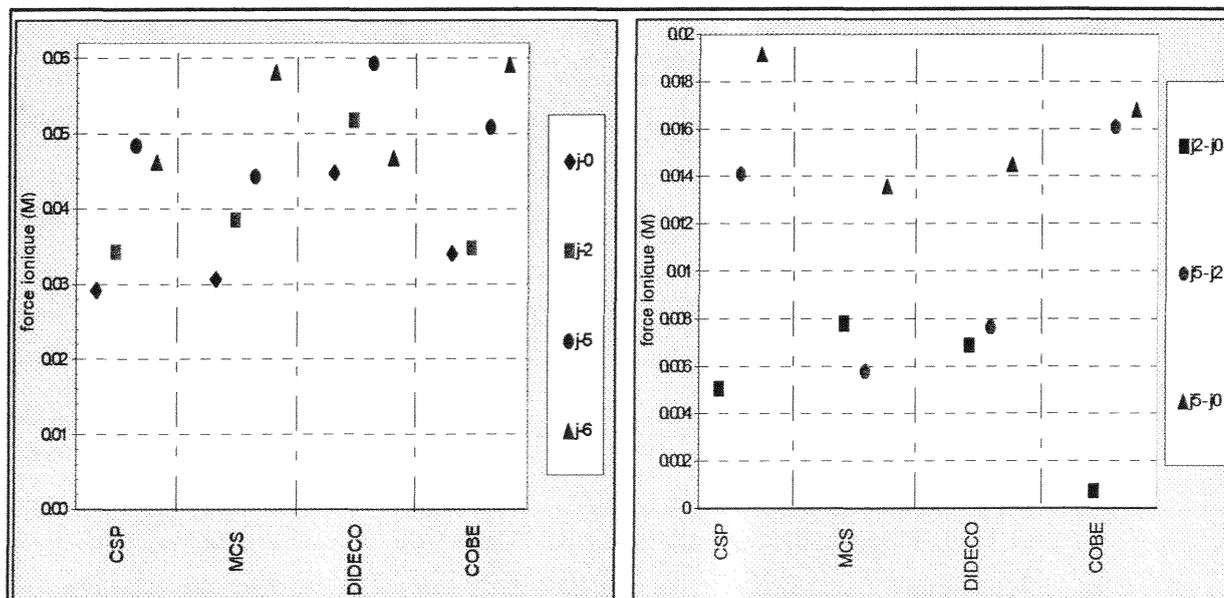


Figure 56 : représentation des différentes valeurs de l'indice 50% de transmission (exprimée en force ionique) suivant le concentré préparé et suivant le délai de conservation. CSP (concentré standard plaquettaire), MCS DIDECO et COBE (concentré plaquettaire préparé par aphérèse avec respectivement les séparateurs MCS, DIDECO et COBE).

La vérification de l'évolution de cet indice en fonction des jours de conservation est aisée. Chaque graphique permet d'effectuer des comparaisons, et d'établir des classements entre les différents concentrés en terme de résistance osmotique, implicitement en terme de viabilité plaquettaire (cf tab XII).

Tableau XII : classement des différents concentrés suivant les jours de conservation en fonction de l'indice de résistance osmotique 50% de Transmission

Jour	Classement
J=0	Didéco >> Cobe > MCS ≥ CSP
J=2	Didéco >> MCS > Cobe ≥ CSP
J=5	Didéco >> Cobe > CSP > MCS
J=6	Cobe ≥ MCS >> CSP

plus à droite : résistance osmotique la plus importante (meilleure viabilité).

plus à gauche : résistance osmotique diminuée (viabilité réduite).

≥ : écart faible. > : écart détectable. >> : écart important.

remarque : Les valeurs de l'indice au 6<sup>ème</sup> jour sont à prendre avec réserve car pour certaines poches les mesures n'ont pu être effectuées.

Les graphiques en bas de la figure 51 permettent d'observer de quelle manière l'indice de résistance osmotique évolue, par le calcul de la différence entre les valeurs prises par cet indice à  $j=0$ ,  $j=2$  et  $j=5$ . L'évolution est plus régulière pour les concentrés MCS et Didéco du premier au 5<sup>ème</sup> jour. Pour les concentrés CSP et Cobe, l'indice est stable les deux premiers jours, puis évolue rapidement jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour.

## **8.2. Activation plaquettaire**

L'activation plaquettaire est associée à des variations de l'expression de surface des glycoprotéines membranaires (diminution de GPIb (CD42b) ; augmentation de GPIIb/IIIa (CD41), expression de P-sélectine (CD62P)...). L'étude par cytométrie en flux, à l'aide d'un étalon, permet de quantifier en nombre de glycoprotéine par plaquette et ainsi de pouvoir évaluer l'état d'activation plaquettaire. Le calibrant développé pour l'analyse plaquettaire est constitué de quatre populations de billes de latex de petite taille de 2 $\mu$ m, capables de mesurer de 500 à 60 000 molécules de Gp par plaquette.

La quantification des glycoprotéines plaquettaires a été appliquée à l'analyse des plaquettes provenant de différents systèmes d'aphérèse, à J0 (soit le jour de la séparation), et à J3 et J5 (soit durant la période légale de conservation des poches plaquettaires. Les résultats sont indiqués dans le tableau XII. Si pour CD41, CD61, et CD42 les populations analysées sont homogènes, l'expression de CD62P permet d'individualiser deux populations par rapport au seuil de positivité, ce qui a conduit à exprimer les résultats également en % de cellule positives.

Sans réaliser d'analyse statistique, les valeurs apportent des renseignements intéressants : l'analyse de l'expression de CD41, CD61 et de CD62 à J0 permet de discerner deux groupes de séparateurs. Le groupe MCS entraîne une activation plaquettaire plus importante que le groupe Cobe, CSP, Dideco. L'analyse des glycoprotéines à J5 est divergente en fonction du marqueur étudié. L'analyse de CD41 et CD61 montre une activation globalement plus importante pour le groupe MCS et Dideco que le groupe CSP, Cobe. L'analyse de CD62P met en évidence une graduation d'activation MCS>Dideco>CSP>Cobe.

En conclusion, le séparateur MCS semble entraîner les activations plaquettaires les plus importantes aussi bien lors de la séparation que de la conservation. L'étude des modes de séparations, des contraintes de cisaillement appliquées, des matériaux utilisés permettrait d'apporter des explications à ces variations. Cependant ces résultats biologiques doivent être

complétés par des études cliniques de rendement transfusionnel pour connaître la pertinence de cette analyse. La perte de fonctionnalité supposée liée à l'activation plaquettaire entraîne-t-elle une perte du pouvoir hémostatique des concentrés transfusés *in vivo* ?

Tableau XIII : résultats de la quantification des principales glycoprotéines plaquettaires provenant de différents systèmes d'aphérèse et en fonction des jours de conservation.

CD41	j-0		j-2		j-5	
	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type
CSP	43.0	4.0	47.9	3.6	55.7	7.23
MCS	50.5	3.0	56.3	6.8	56.6	9.89
DIDECO	42.8	2.3	42.5	3.3	56.6	18.1
COBE	49.3	6.0	43.5	2.1	43.1	3.41
AMICUS	53.1	6.0	55.3	7.7	57.7	9.16
CD61	j-0		j-2		j-5	
	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type
CSP	48.4	3.4	49.1	3.3	57.3	6.17
MCS	57.3	2.3	60.2	6.0	61.6	8.52
DIDECO	46.1	1.6	44.3	4.2	61.1	22.52
COBE	53.3	5.1	45.0	1.9	42.0	6.13
CD42	j-0		j-2		j-5	
	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type
CSP	38.0	6.1	35.4	6.8	36.0	7
MCS	38.2	3.6	34.7	2.0	33.3	2.07
DIDECO	35.5	4.6	32.7	2.4	28.1	4.59
COBE	38.8	3.2	33.5	1.9	35.6	3.73
CD62	j-0		j-2		j-5	
	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type
CSP	3.1	0.7	5.1	0.8	5.1	0.47
MCS	3.9	0.6	7.2	0.7	5.6	1.61
DIDECO	3.4	0.6	4.3	1.2	5.4	2.74
COBE	2.9	0.3	5.2	0.7	4.5	0.1
CD62 %	j-0		j-2		j-5	
	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type	moy	Ecart-type
CSP	7.4	4.5	17.0	9.3	28.8	15.11
MCS	6.3	1.2	22.3	10.6	30.0	11.62
DIDECO	5.5	1.0	16.5	10.1	46.3	29.34
COBE	5.5	0.8	13.7	1.4	16.3	2.14

### **8.3. Corrélation entre la résistance osmotique et l'activation**

La quantification des marqueurs de l'activation plaquettaire montre des résultats intéressants, qui permettent une distinction entre les quatre catégories de poche (classement en fonction des jours de conservation et en fonction du séparateur utilisé). Mais aucune corrélation significative entre le test de résistance osmotique et la quantification des glycoprotéines membranaires semble se révéler. Ces deux tests semblent approcher des paramètres plaquettaires différents. La complémentarité de ces deux tests permettra de caractériser au mieux la viabilité des plaquettes.

## **9. EVALUATION DES CONCENTRES PLAQUETTAIRES PREPARES PAR LE SEPARATEUR AMICUS**

Dans le cadre d'une évaluation de la technique de préparation des concentrés plaquettaires obtenus par le séparateur Amicus, un protocole de mesure de la résistance osmotique par dialyse lente et par choc a été réalisé sur une série de 10 donneurs. Ces résultats complètent l'analyse effectuée à partir d'autres examens : quantification des glycoprotéines membranaires (facteur d'activation), numération (concentration cellulaire et indice volumétrique des plaquettes), dosage de la bêta thromboglobuline, dosage des gaz du sang (PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, pH), dosage de l'acide lactique, dosage du glucose, mesure du pH.

Les deux tests de réponse à une contrainte hypotonique sont réalisés sur le Fragilimètre.

Les résultats (fig 57) de la résistance osmotique (technique utilisant une dialyse lente) sont en relation avec ceux établis dans le protocole du § 7 (influence du séparateur sur les préparations de concentrés plaquettaires). Le coefficient de variation à  $j=0$  pour les valeurs des différents indices (seuils de transmission en fonction de la force ionique) reste élevé. La technique de séparation appliquée en mode bi et unipuncture montre ainsi des mêmes caractéristiques quant à l'incidence sur les plaquettes. Le suivi de la conservation en terme de viabilité des 10 concentrés montre une évolution après le deuxième jour. En effet les résultats des mesures à  $j=0$  et  $j=2$  sont très proches. Un faible décalage (inférieur à ceux constatés dans le protocole du § 8, pour d'autres séparateurs) de la courbe vers la gauche au cinquième jour de conservation ne permet pas de considérer de façon significative une diminution de la viabilité des plaquettes.

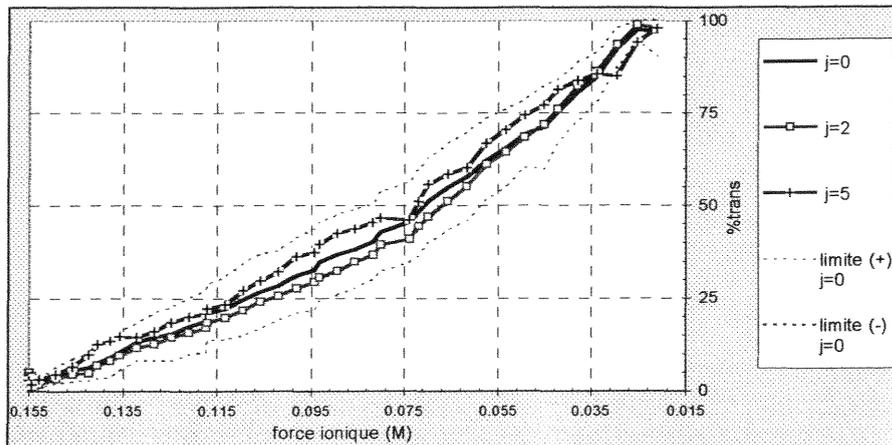


Figure 57 : courbes moyennes de résistance osmotique plaquettaire en fonction de la force ionique, obtenues suivant le temps de conservation de 10 concentrés préparés par le séparateur Amicus.  
(les courbes enveloppes construites à partir du calcul des valeurs moyennes à  $j=0 \pm \sigma$  sont présentées)

Le tableau XIII permet de préciser l'analyse précédente. Les écarts entre les moyennes calculées pour les seuils de transmission (25,50,75%), en fonction de la force ionique et suivant le délai de conservation ( $j=0$ ,  $j=2$  et  $j=5$ ), sont inférieurs aux valeurs des écart-types de ces indices spécifiés à  $j=0$ . Ce qui signifie que l'évolution constatée entre le premier et le cinquième jour de conservation ne permet pas de sortir de l'enveloppe définie par les écart-types à  $j=0$  (fig 57). Ce résultat est mis encore plus en évidence par la figure 58.

Tableau XIII : valeurs des indices caractéristiques de la résistance osmotique plaquettaire obtenues pour 10 concentrés conservés sur 5 jours et préparés par le séparateur Amicus.

N = 10	j=0			j=2			j=5		
	moyenne	Ec	Coef. var. %	moyenne	Ec	Coef. var. %	moyenne	Ec	Coef. var. %
Ampli Signal (déc.)	427.0	82.5	19.3	332.3	72.7	21.9	275.8	97.0	35.2
pente déc. init	0.717	0.206	28.8	0.461	0.112	24.3	0.409	0.125	30.6
trans init (M)	0.1486	0.0032	2.1	0.1519	0.0031	2.0	0.1502	0.0051	3.4
trans 25% (M)	0.0951	0.0138	14.5	0.0945	0.0171	18.1	0.0967	0.0182	18.8
trans 50% (M)	0.0613	0.0130	21.2	0.0596	0.0117	19.6	0.0634	0.0187	29.5
trans 75% (M)	0.0365	0.0093	25.3	0.0370	0.0069	18.8	0.0407	0.0093	22.8

Ampli Signal (valeurs décimales) : amplitude maximum du signal de transmission lumineuse captée pendant la mesure.  
Pente déc. Init : valeur de la pente initiale de la courbe de transmission en valeurs arbitraires.  
Trans init, 25, 50, 75 % : indices exprimés en force ionique.

Les valeurs du tableau ci-dessus permettent de vérifier que l'amplitude du signal lumineux capté tend à diminuer en fonction des jours de conservation. Parallèlement la pente de ce signal pour les valeurs arbitraires décroît également suivant le délai de conservation des concentrés plaquettaires. En considérant que la concentration cellulaire reste suffisamment stable pendant les cinq jours de conservation, ces résultats montrent ainsi que la population plaquettaire en moyenne

est caractérisée par une amplitude de gonflement décroissante, et que la lyse pour les cellules les plus fragilisées intervient plus tôt.

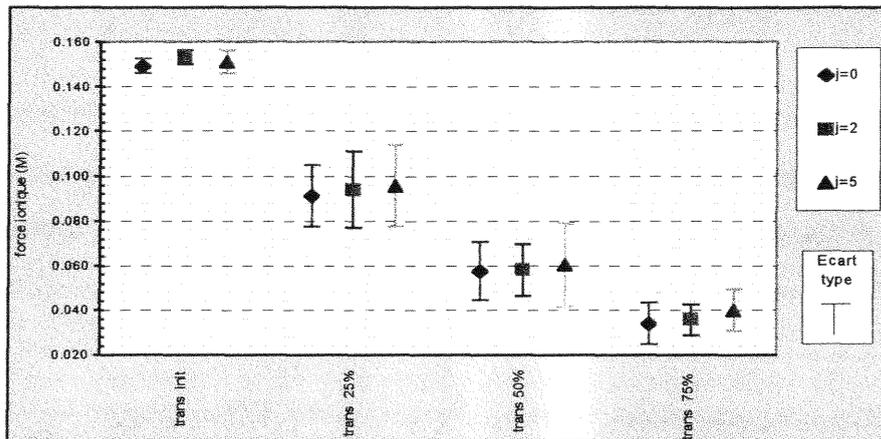


Figure 58 : valeurs moyennes, exprimées en force ionique (M), des indices de la résistance osmotique pour 10 concentrés plaquetaires préparés par le séparateur Amicus et conservés 5 jours.

Les mesures RCH sont réalisées sur les mêmes préparations de PRP (concentration ramenée à environ  $300.10^9$  plaquettes/L par dilution avec le PPP). Le choc pratiqué correspond à une dilution  $\frac{1}{2}$  entre la suspension plaquettaire et l'eau distillée. La figure 59 permet d'observer les résultats obtenus.

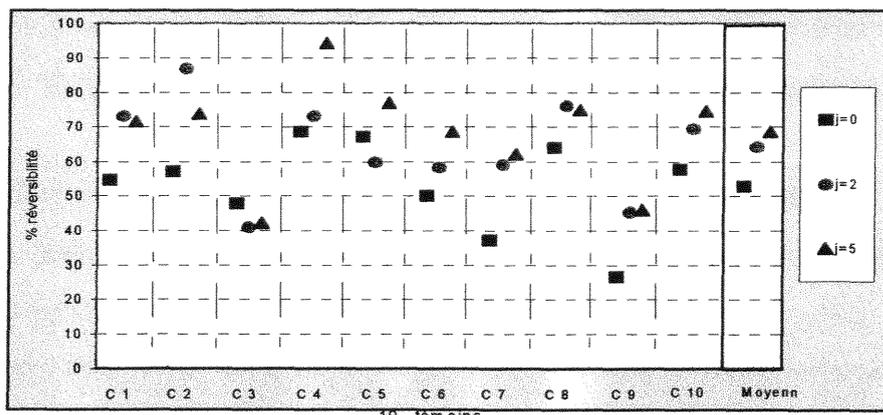


Figure 59 : résultats du test RCH pour le suivi de 10 concentrés plaquetaires conservés et préparés par le séparateur Amicus.

L'indice calculé correspondant au pourcentage de réversibilité des plaquettes (potentiel de retour à une forme initiale après gonflement) augmente, en moyenne, en fonction des jours de conservation.

A ce stade des travaux, les résultats des autres tests pratiqués pour cette étude ne sont pas encore connus. L'interprétation de l'ensemble avec des tentatives de corrélation entre certains paramètres caractéristiques de la viabilité cellulaire sera d'un intérêt certain.

## 10. BILAN SUR LES RESULTATS

Les résultats obtenus pour ces différentes séries d'expériences permettent de mieux se sensibiliser aux possibilités offertes par ces tests de réponse des plaquettes à une contrainte hypotonique progressive ou brutale. Le fragilimètre est l'outil proposé pour approcher la notion de résistance osmotique des plaquettes, synonyme de viabilité cellulaire.

L'objectif premier de ces mesures est d'essayer de montrer la fiabilité du test impliquant une dialyse lente. Pour cette raison, seuls les résultats de ce dernier vont être discutés. L'application au test RCH s'est effectuée en second ordre, et une évaluation limitée a été réalisée.

### **10.1. La première phase a permis de définir les conditions préanalytiques en évaluant l'influence de deux anticoagulants (citrate et EDTA), de la numération cellulaire et de la température.**

Les résultats mettent en évidence des différences selon l'anticoagulant utilisé. Avec l'EDTA, le système canaliculaire de la cellule est ouvert, d'où un gonflement plus rapide des cellules. Cet anticoagulant diminue la concentration calcique à un niveau tel que l'adénosine diphosphate ne peut plus agréger les plaquettes, mais il provoque des altérations métaboliques, morphologiques et fonctionnelles (106). Les plaquettes montrent une résistance plus importante avec le citrate de sodium. L'analyse des seuils initiaux de transmission lumineuse, ainsi que de l'amplitude de ces signaux en valeurs arbitraires, pourrait servir de base de calcul pour définir une morphologie générale en début de mesure et suivre son évolution au cours du test. Des mesures complémentaires ont également permis d'éliminer la sédimentation et l'agrégation comme source d'erreur.

A titre de comparaison, la figure 60 permet de résumer et d'illustrer les courbes de transmission en fonction de la force ionique obtenues pour des suspensions de plaquettes (EDTA

et Citrate) et une suspension d'hématies (EDTA). La différence de comportement osmotique entre ces deux cellules est ainsi précisée.

Les résultats de fragilité plaquettaire obtenus sont indépendants de la concentration cellulaire, si cette dernière est comprise entre  $100 \cdot 10^9$  et  $500 \cdot 10^9$  plaquettes/L. L'information déduite de la différence entre la densité optique du PPP et du PRP d'un même donneur permettra de fournir à l'utilisateur une approche de la concentration en plaquettes. Des mesures de résistance osmotique effectuées directement sur des solutions pures de concentrés plaquettaires ( $1 \cdot 10^{12}$  à  $1,4 \cdot 10^{12}$  plaquettes/L) montrent un décalage des courbes de transmission lumineuse en fonction de la force ionique vers la droite. La concentration élevée et la nature du milieu de suspension semblent favoriser une meilleure résistance osmotique.

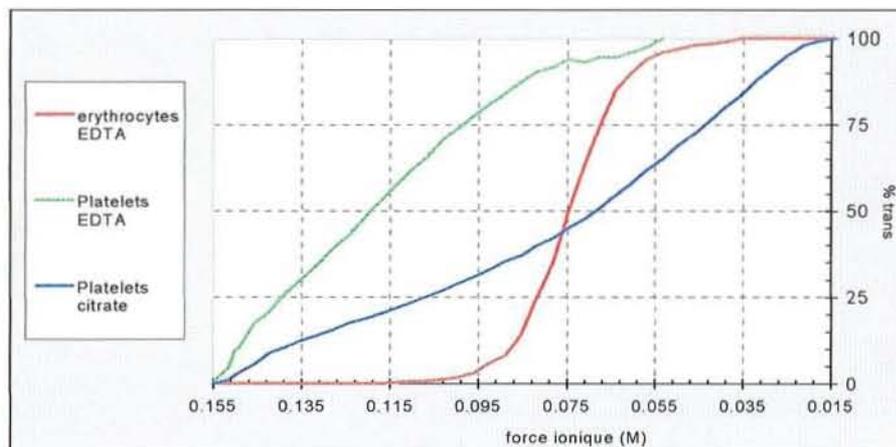


Figure 60 : courbes témoins de la résistance osmotique des hématies (EDTA) et des plaquettes (EDTA, citrate).

La température est également un facteur prépondérant au niveau du gonflement osmotique des plaquettes et donc de leur résistance à l'influx d'eau. Les plaquettes présentent une fragilité diminuée aux températures basses (8-10°C). Cette analyse confirme les résultats présentés par Zahavi (47) en utilisant le Fragiligraph. La température de 37°C provoque une fragilisation des plaquettes. Comme l'avait précisé Vigneron (107), la plus forte résistance des plaquettes à l'hypotonie par abaissement de la température est semblable à ce qui est décrit pour l'érythrocyte et résulte vraisemblablement du changement des propriétés élastiques de la membrane.

## **10.2. Première application de ce test dans un protocole d'étude**

L'analyse de l'incidence d'une procédure de traitement pour des patients dialysés, a montré une augmentation de la résistance osmotique des plaquettes après cette phase thérapeutique. L'opération de traitement semble favoriser une sorte d'épuration des cellules les plus fragiles (âgées). Le prélèvement sanguin après dialyse du patient semblerait donc composé de cellules en moyenne plus jeunes et ainsi plus résistantes à une contrainte hypotonique.

## **10.3. L'évaluation de la viabilité des concentrés plaquettaires suivant le mode de préparation ou le délai de conservation constitue la deuxième phase de l'étude.**

L'influence de la technologie de séparation pour préparer des concentrés plaquettaires en aphasère, sur la viabilité, peut être caractérisée par la résistance osmotique. Les mesures sont sensibles aux traitements que subissent les plaquettes.

L'étude de la conservation de différents concentrés plaquettaires, met en évidence une diminution de la résistance osmotique en fonction des jours écoulés. La diminution de l'amplitude du signal de transmission lumineuse couplée à une stabilité de la concentration plaquettaire, démontre un affaiblissement de la faculté de gonflement, voire une rupture de la membrane (lyse) plus rapide. Les seuils de transmission calculés (25, 50, 75%) qui correspondent à une force ionique plus faible à  $j=5$  qu'à  $j=0$ , sont des indices de caractérisation de la mesure de la résistance osmotique. Ces résultats globaux permettent de préciser la viabilité potentielle des plaquettes conservées. La viabilité des plaquettes évolue différemment suivant le type de concentrés préparés. Un classement des différents séparateurs cellulaires en fonction de l'efficacité est possible.

Le test de résistance osmotique s'est incorporé dans un protocole d'étude concernant l'évaluation du séparateur Amicus de chez Baxter. Cette première étape permet de proposer l'utilisation du Fragilimètre à des spécialistes et de comparer les résultats avec d'autres tests référencés. Cet outil de séparation cellulaire permet de préparer des poches de concentrés

présentant une résistance osmotique relativement hétérogène comparée aux autres séparateurs. Par contre, ces suspensions semblent mieux préparées à une conservation sur cinq jours.

Cette étude "Amicus", a été également l'occasion d'évaluer le test RCH. Les résultats obtenus permettent de vérifier le principe de mesure. Une augmentation de l'indice de réversibilité semble constatée en fonction des jours de conservation (pourtant l'altération des plaquettes causée par le délai de conservation devrait diminuer cette capacité de retour à une forme initiale suite au choc osmotique). Et, une diminution du pourcentage de gonflement est observée suivant le délai de conservation (corrélant les résultats obtenus avec l'autre test). Une étude un peu similaire effectuée par Jung (76) a montré que cet indice reste quasiment stable sur cinq jours (RCH en transmission sur des poches CPA). Ce premier bilan permettra une optimisation de la technique (RCH) pratiquée sur le Fragilimètre, et surtout un ajustement des paramètres de concentration et de dilution pour des résultats plus sensibles. Ainsi, il serait peut être plus judicieux d'effectuer des chocs osmotiques avec une dilution 1/3 : 2 volumes de PRP (concentration proche de  $300 \cdot 10^9$  plaquettes/L sur citrate) avec 1 volume d'eau distillée. Cette contrainte hypotonique limitée autorisera un gonflement sans dommage majeur des plaquettes.

Les différentes caractérisations de la viabilité des plaquettes sont permises par la sensibilité significative du test de réponse osmotique des plaquettes par dialyse lente. Les résultats pour chaque analyse sont riches en informations. Régulièrement dans cette étude, la caractérisation des échantillons s'est appuyée sur les indices de résistance osmotique définis par des seuils de transmission calculés en pourcentage de la pleine échelle, exprimés en force ionique. Ceux-ci sont indispensables pour une première approche de la viabilité des plaquettes. La prise en compte de certains paramètres déduits des valeurs arbitraires (amplitude et pente du signal lumineux) se révélera certainement très importante pour affiner l'évaluation de la viabilité des plaquettes étudiées.

Ces premiers éléments d'évaluation du test proposé :

***réponse des plaquettes à des variations de pression osmotique,***

permettent d'approcher les notions de fragilité osmotique ou résistance osmotique des plaquettes dans différentes situations hématologiques (107).



*Synthèse sur la  
mesure de fragilité  
plaquettaire*

La physiologie et le rôle de la plaquette dans la circulation sanguine semblent désormais bien connus. La plaquette est fortement impliquée dans l'hémostase primaire, par sa capacité d'activation, et dans le mécanisme de la coagulation.

L'importance de cet élément dans l'organisme nécessite d'approfondir les recherches pour accroître les connaissances sur ses propriétés, de diagnostiquer les éventuelles anomalies de fonctionnalité et de contrôler sa viabilité dans différentes conditions hématologiques. La plaquette est un des éléments figurés du sang les plus complexes : forme, structure, rôle, ... .

L'étude des propriétés rhéologiques et l'évaluation de la viabilité des plaquettes, peuvent être effectuées par l'exploration de la fragilité osmotique.

Les caractéristiques de cette cellule (petite, transparente, d'activation facile, ...), complétées d'un travail bibliographique basé sur l'approche du comportement des plaquettes en milieu hypotonique, ont permis une sensibilisation aux différents problèmes de mise en œuvre d'un test de suivi du comportement osmotique de ces cellules.

**L'objectif de ce travail** était donc de développer une nouvelle technique entièrement automatique de mesure de la résistance osmotique des plaquettes et d'apporter les premiers éléments de validation de cette technique. Les deux principales fonctions de l'appareil se sont attachées à l'utilisation d'une dialyse lente pour provoquer la décroissance de la force ionique dans la suspension analysée, et au choix d'une lecture de variation de transmission lumineuse à travers la suspension plaquettaire comme source d'informations pour caractériser les modifications morphologiques des plaquettes.

L'analyse de la réponse du système semble confirmer les attentes théoriques et les informations tirées de la bibliographie (voire "Etat et approfondissement de la question" § 7 partie III). La diminution progressive de la force ionique au niveau de la suspension étudiée induit un gonflement, également progressif, des cellules (par influx d'eau à l'intérieur des cellules pour compenser la variation de pression osmotique entre le milieu intra et extra cellulaire). Une relation de proportionnalité entre ces deux données semble s'établir. En effet les courbes obtenues : évolution du signal de conductance et de transmission en fonction du temps, révèlent effectivement une variation inverse, mais proportionnelle (avec évolution de la proportionnalité au cours de la mesure). La construction de la courbe de transmission lumineuse en fonction de la force ionique, exprimée entre 0 et 100% de la pleine échelle, permet de définir la cinétique de gonflement des plaquettes. Les indices de transmission (init, 25, 50, 75 %) pourraient être corrélés à des seuils de changement de volume.

Le calcul des pentes permettrait de définir une vitesse de gonflement des plaquettes, et donc d'approcher leur résistance membranaire. Une pathologie des membranes plaquettaires, ou une éventuelle vieillissement des cellules, ou une altération des membranes, ..., suffirait à modifier cette cinétique de gonflement. L'analyse des résultats permettra de distinguer ces différents cas de fragilisation des plaquettes (déplacement de la courbe notée "classique" vers la gauche).

Toute cette approche est permise en considérant les propriétés optiques des plaquettes. La technologie choisie pour mesurer ces changements de volume semble suffisamment sensible et fiable. Les données théoriques complétées par les travaux de divers auteurs et par les expérimentations menées, semblent autoriser l'analyse d'une variation de transmission lumineuse à travers une suspension de plaquettes afin de caractériser les modifications géométriques des cellules.

Le graphique (fig 61) peut permettre de résumer le comportement morphologique des plaquettes soumises à des variations de pression osmotique différentes. En premier lieu, la décroissance de la force ionique (0,155 M à 0,02 M) induit un gonflement des cellules. Au contraire une augmentation progressive de la force ionique (0,155 M à 0,2 M) conduit à un rétrécissement des plaquettes. Si la première suspension (plaquettes gonflées) est utilisée pour une mesure avec une dialyse contre une solution isotonique, alors les plaquettes retournent vers leur géométrie initiale (normale ?). Si avec la deuxième suspension (plaquettes rétractées) une mesure "classique" est effectuée (dialyse contre l'eau distillée), alors les plaquettes gonflent. La relation entre le gonflement ou le rétrécissement des cellules en fonction de la force ionique est significative. Par contre, les différentes limites hypertoniques ou hypotoniques, que peuvent subir les plaquettes sans dommage, restent à être approcher, voire à quantifier.

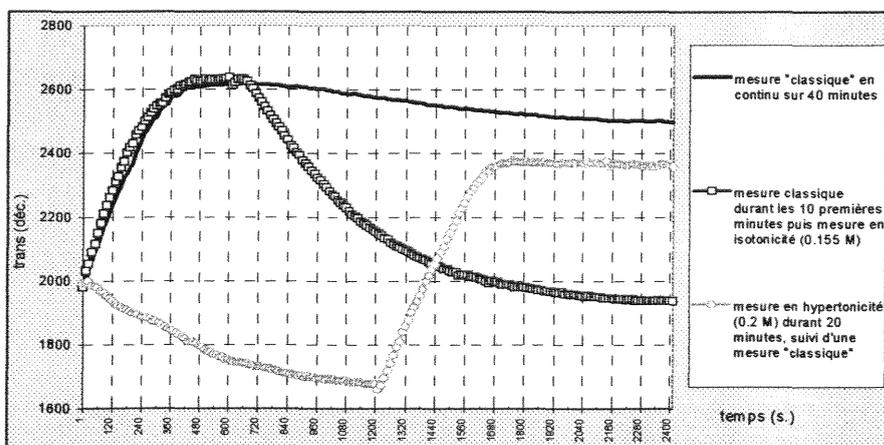


Figure 61 : représentation des transmissions lumineuses, en valeurs arbitraires en fonction du temps, en relation avec différentes conditions de mesures appliquées à un même PRP (plaquettes issues de sang total prélevé sur l'anticoagulant EDTA).

Le suivi de la lyse cellulaire pendant les mesures est plus délicate. Initialement, il est judicieux de bien déterminer ce que représente la lyse des plaquettes. La lyse ne peut être associée à la détérioration totale de la cellule en petits fragments membranaires. Par contre, la sécrétion de certaines substances et de certains constituants cytoplasmiques (granules par exemple) est significative de la lyse. Ainsi, cette dernière peut être appréciée par la mesure de la libération progressive d'un facteur plaquettaire comme la sérotonine, la bêta thromboglobuline, ... . La morphologie plaquettaire résultante de la lyse peut se caractériser par une "ombre" cellulaire. La plaquette conserve sa paroi membranaire. Une augmentation de volume excessive, par un dépassement du seuil critique de gonflement osmotique, semble induire un début de lyse. Ainsi l'ouverture de pores dans la membrane plasmique favoriserait la libération des constituants intracellulaires. Compte tenu de l'information lumineuse recueillie, dépendante du changement de volume mais plus encore du changement d'indice dans la cellule (par dilution ou sécrétion des constituants), les mesures effectuées devraient être sensibles à ce facteur de lyse.

La recherche des valeurs en force ionique engendrant le début de la lyse cellulaire reste délicate dans son approche. La définition d'une fonction arithmétique de calcul pour dissocier la cinétique de gonflement de la lyse cellulaire sera certainement nécessaire.

Les résultats, publiés par Vigneron (108), sur la détermination du pourcentage de lyse en fonction de la force ionique pour des plaquettes issues de sang total prélevé sur EDTA sont illustrés sur la figure 62. Le degré de lyse a été évalué par la mesure des protéines plaquettaires libérées (contrôle des résultats par la mesure d'autres paramètres : activités enzymatiques par exemple). Le graphique présenté fournit également les caractéristiques de la réponse osmotique des plaquettes (issues de sang total prélevé sur EDTA), mesurées par le Fragilimètre en dialyse lente. Les valeurs de forces ioniques correspondant au début de lyse (écart type important) et celles correspondant à l'indice 100 % de transmission sont très proches. Cette analyse semblerait donc indiquer que la lyse dans notre système débiterait dès l'atteinte du seuil 100% de transmission. Si pour ce seuil de transmission maximale, il est considéré que la plaquette a atteint son volume critique, la suite des informations recueillies pourrait permettre de préciser ce paramètre de lyse cellulaire.

Les résultats concernant la mesure de la lyse ont été déterminés par une technique basée sur des chocs hypotoniques (adaptation de la technique habituellement appliquée à la mesure de la fragilité des hématies : Dacie). La dialyse quant à elle, même si elle permet aux plaquettes de subir le choc de manière progressive, provoque une chute de la force ionique jusqu'à environ 0,014 M après 30 min. La pression osmotique exercée se révèle très importante. La lyse devrait donc être constatée.

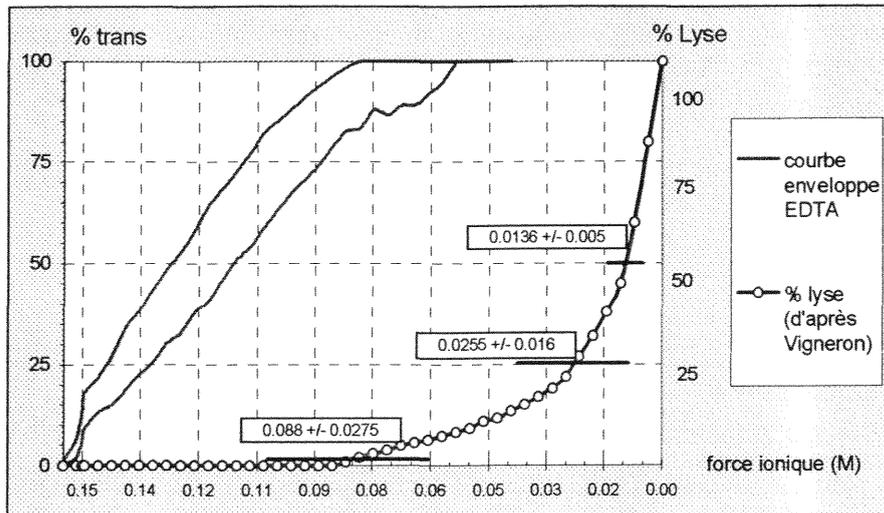
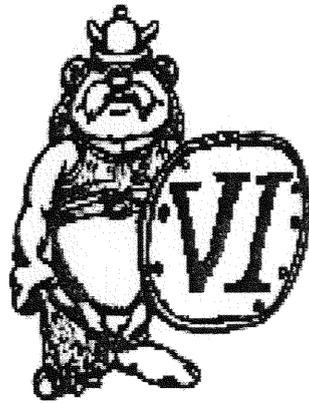


Figure 62 : courbes comparatives de la lyse plaquettaire  
 Courbe représentant le pourcentage de lyse de plaquettes (anticoagulant EDTA) en fonction de la force ionique d'après Vigneron (108), et courbes enveloppes moyennes de la transmission lumineuse, en fonction également de la force ionique, exprimée entre 0 et 100% correspondant à la mesure de la résistance osmotique de plaquettes (prélevées sur EDTA) sur le Fragilimètre en dialyse lente.

Remarque : des mesures effectuées sur des temps plus longs (de 20 à 40 minutes) montrent des résultats différents pour la partie des courbes consécutives au seuil 100% de transmission. En effet, soit la transmission maximale demeure quasi constante (légère diminution au cours du temps), soit une chute de transmission lumineuse est constatée. L'interprétation est trop délicate pour l'instant, mais il est certain que d'autres phénomènes physiologiques propres aux plaquettes apparaissent.

Finalement, le gonflement osmotique et la lyse semblent être des facteurs d'approche de la viabilité des plaquettes. Une suspension de PRP, préparée par centrifugation classique à partir de sang total, se compose de différentes populations en fonction de l'âge des cellules. Effectivement, une plaquette est caractérisée par une durée de vie limitée (7 jours). En considérant que des cellules vieillissantes sont plus fragiles osmotiquement, le test effectué sur le Fragilimètre devrait y être sensible. L'analyse du comportement osmotique sera dépendante de l'âge moyen des cellules, et une procédure de déconvolution du signal mesuré (par exemple) permettra peut être une distinction entre des populations cellulaires en terme de fragilité.

Désormais, le Fragilimètre propose donc deux tests de réponse osmotique des plaquettes. Le test RCH déjà connu par un certain nombre de laboratoires peut être réalisé de façon entièrement automatique avec éditions et sauvegardes des résultats. Le deuxième, thème principal de cette étude, permet quant à lui des analyses plus poussées et plus riches en informations sur le comportement des plaquettes dans des situations hypo ou hypertoniques.



*Evolutions  
Technologiques en vue  
du Transfert Industriel*

## 1. INTRODUCTION

Le premier projet qui se proposait de fournir un système de mesure semi-automatique de la résistance osmotique des membranes des hématies, s'est décomposé en trois principales phases consécutives : étude de faisabilité, mise en œuvre d'un prototype, **transfert industriel**.

La mesure d'hémolyse est encore actuellement réalisée manuellement (technique dite "Dacie"). Bien qu'elle renseigne sur l'évolution de certaines pathologies du sang, elle est boudée par les laboratoires d'hématologie parce que longue et fastidieuse. La réalisation d'un appareil de mesure automatique réconciliera cette technique avec le milieu médical.

La mise au point d'un prototype a permis initialement l'optimisation technique de la mesure. Depuis sa conception de nombreux protocoles d'étude sur la fragilité des hématies ont été conduits, ce qui démontre d'une part la fiabilité de l'appareil et d'autre part l'intérêt porté à ces mesures. La sensibilité des mesures et la reproductibilité des résultats sont satisfaisantes et autorisent l'étape suivante : le transfert industriel.

La commercialisation des premiers appareils permettra d'établir une validation biologique. En plaçant plusieurs de ces appareils dans des centres d'analyses en hématologie, une comparaison des mesures sur des mêmes types d'échantillons de sang servira de support à cette validation.

Le transfert industriel pour ce projet technique a donné lieu à la création d'un contrat de licence (N° 96 014) entre l'Université H. Poincaré et la société Régulest. Cette entreprise acquiert ainsi les données technologiques et se charge de la commercialisation.

La version prototype du Fragilimètre avait été élaborée pour répondre à l'objectif de sa future industrialisation. Mon intervention devait s'attacher à une évolution de l'appareil en considérant les différents coûts (réalisation, matériels), les nouveaux choix technologiques, l'encombrement, les directives proposées par la société chargée de la commercialisation et en incluant les adaptations aux nouveaux tests proposés pour le suivi de la fragilité osmotique des plaquettes. Le souci pour chaque industriel est de disposer d'un outil fiable fournissant les résultats escomptés avec une technologie avancée et de coût réduit. L'appareil regroupe quatre grands domaines d'activité : mécanique, optique, électronique et informatique.

Les différentes étapes du transfert technologique se sont donc construites ainsi :

- élaboration du cahier des charges en tenant compte de l'évaluation du prototype, des améliorations envisagées, du choix des matériels, des choix de l'industriel, ... ;
- modifications des dessins mécaniques et réalisation des différentes pièces ;
- étude et réalisation des cartes électroniques plus compactes ;
- adaptation du logiciel informatique aux choix matériels, évolution dans le cadre des tests de réponse des plaquettes aux variations de pression osmotique ;
- montage, réglages, essais, mesures ;
- validation technique ;
- réalisation du dossier technique regroupant toutes les données nécessaires à la construction d'un appareil.

Ces différentes phases vont composer cette partie du document, en se consacrant aux généralités, sans surcharge de données ou d'illustrations techniques pour respecter une certaine confidentialité. Le dossier technique réalisé, qui est entre les mains de l'industriel, doit demeurer confidentiel.

## 2. CAHIER DES CHARGES

Le cahier des charges a été établi en collaboration avec M Bauquis l'industriel concerné, M Didelon le concepteur initial, M Stoltz directeur du laboratoire, et moi-même.

La figure 63 permet de montrer la vue d'ensemble du prototype Fragilimètre.

Les plus importantes modifications ou adaptations concernent la mise en œuvre de moteurs pas à pas pour remplacer les moteurs synchrones ferrites, le remplacement de la source laser par une petite diode laser (alimentation 0 et 5 v), réduction du nombre de composants électroniques et du câblage, la diminution des dimensions de l'appareil, l'amélioration du système de fixation des sondes de conductance, l'adaptation du logiciel informatique, ...

L'analyse s'est effectuée par module (voir figure 63), en détaillant des sous rubriques correspondant aux éléments à supprimer, à modifier et à créer.

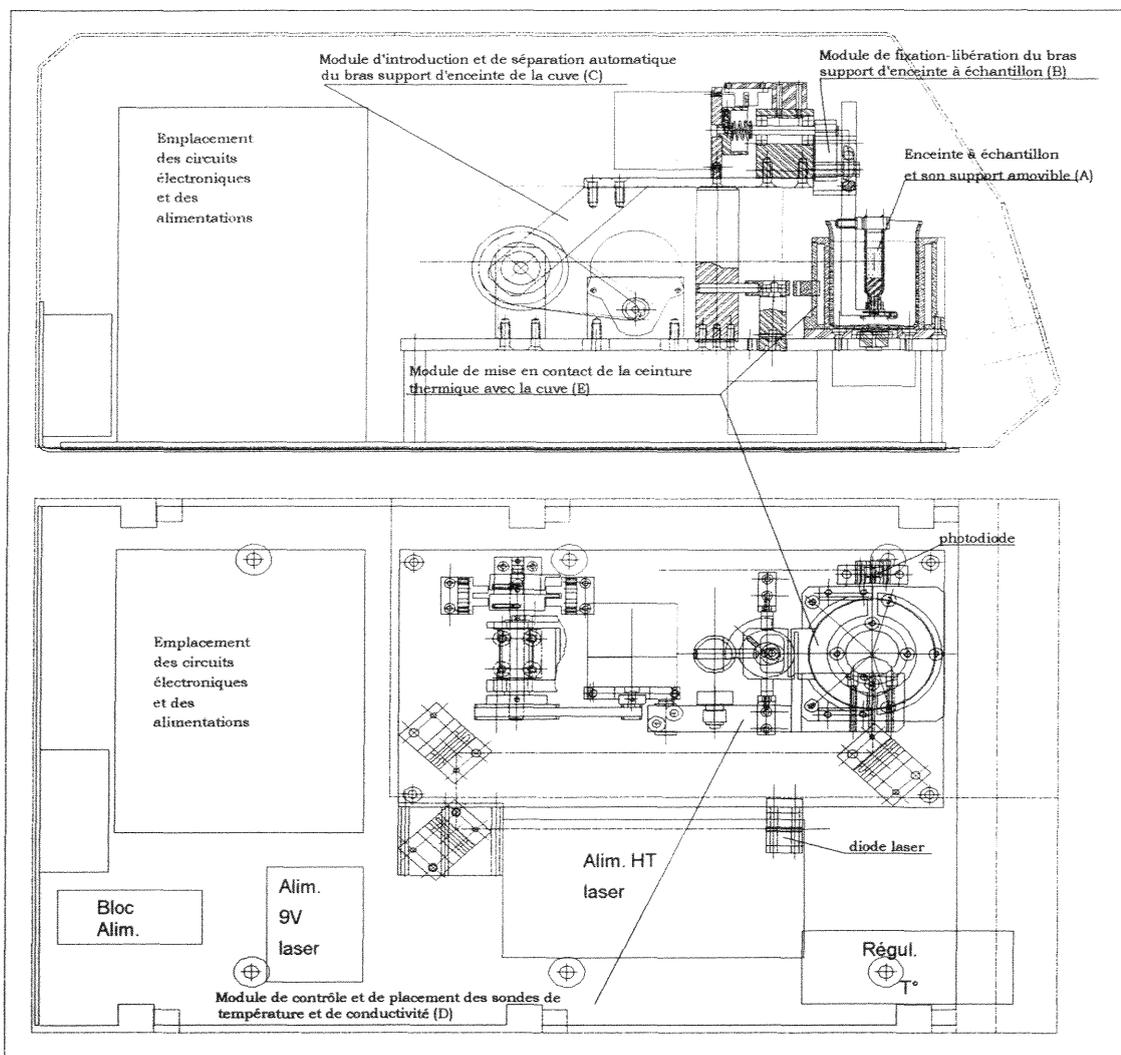


Figure 63 : schémas mécaniques correspondant aux vues d'ensemble du Fragilimètre prototype (vue de dessus : partie inférieure de la figure, vue de côté : partie supérieure de la figure).

## **2.1. Section mécanique**

### **⇒ *Module de fixation-libération du bras support d'enceinte à échantillon***

#### suppression :

- du moteur (accompagné de ces pièces de fixation) ;
- des capteurs optoélectroniques et des pièces de début et de fin de course.

#### modification :

- position et forme du ressort, pour conserver le système de pression sur le porte échantillon ;
- les pièces "support" sont scindées en une seule ;
- longueur de l'axe de rotation à ajuster.

### **⇒ *Module d'introduction-séparation automatique du bras support d'enceinte dans la cuve***

#### suppression :

- du système de roues dentées et de la courroie ;
- du moteur Crouzet synchrone ;
- des différentes pièces liées à ce type de moteur.

#### modification :

- différentes pièces pour n'autoriser que des mouvements automatiques (la possibilité de lever la platine manuellement est supprimée) ;
- bagues (rondelles) entre les différentes pièces le long de l'axe.

#### création :

- insertion d'une bague de liaison entre le moteur et l'axe principal (joint Oldham) ;
- support du moteur pas à pas ;
- support pour capteurs optoélectroniques (position intermédiaire) ;
- roue codée sur axe (position intermédiaire).

### **⇒ *Platine support des sondes de conductances et de la sonde de température***

#### modification :

- système de fixation des sondes de conductance ;
- épaisseur de la pièce ;

- fixation des câbles électriques.

### ⇒ *Module optique*

#### suppression :

- diode Laser avec son alimentation spécifique ;
- pièce support de la diode ;
- une partie des guides optiques et de leur support (le chemin optique est réduit).

#### modification :

- sur le guide optique restant (proximité de la cuve de mesure), une lame semi-transparente remplace le miroir.

#### création :

- support de la nouvelle diode Laser.

### ⇒ *Platine inférieure*

#### modification :

- créer et vérifier les différents points de perçage par rapport aux nouvelles pièces et celles supprimées.

### ⇒ *Coffret*

#### suppression :

- contre poids de la porte.

#### modification :

- dimensions des pattes d'emboîtement sur le châssis ;
- vérification des différentes cotes portées sur les dessins.

### ⇒ *Divers*

- modification des pièces support des cartes électroniques suivant les choix effectués ;
- suppression ou non du ventilateur pour le refroidissement de la ceinture thermique ?

## **2.2. Section électronique**

### suppression :

- électronique pour le module de libération - fixation du bras support d'enceinte à échantillon ;
- 4 sorties BNC à l'arrière de l'appareil ;
- régulateur CAL 9900 ;
- signalisation sur la face avant ;
- commande des moteurs synchrones ferrites (configuration : relais).

### modification :

- amplification des signaux mesurés (transmission lumineuse, conductance, température), réduire le nombre de circuits intégrés ;
- différentes possibilités dans le choix des composants ;
- alimentation des différentes cartes, circuits et composants (diode Laser, résistances de puissance pour la montée en température de la ceinture thermique, ...);
- possibilité d'utiliser une seule carte multitensions avec une puissance suffisante ;
- optimisation du câblage, réduire la connectique.

### création :

- régulation de température, assurée par une carte électronique à créer (composants spécifiques, consigne envoyée par le micro-ordinateur). Cette carte assure également l'amplification du signal de température et la commande en puissance des résistances de chauffage ;
- commande électronique du moteur pas à pas (circuits à définir).

## **2.3. Section informatique**

### suppression :

- certains calculs et certains affichages, principalement au niveau de la feuille de résultat (tout ce qui n'est pas utile pour l'interprétation de la mesure) ;
- tracé des aires sous la courbe (limiter la consommation d'encre) ;
- calculs et impressions des paramètres non caractéristiques (F(t) à 50%, et les divers calculs de surface).

#### modification :

- commande de montée et descente du module d'introduction de l'enceinte dans la cuve, ainsi que la commande pour serrer ou non la cuve dans la ceinture thermique (gestion des moteurs pas à pas) ;
- gestion de l'imprimante (choix de l'imprimante HP deskjet 660C).

#### création :

- possibilité de choisir la température de consigne, la durée de la mesure ;
- inscription sur la feuille "résultat" de l'heure du début de la mesure ;
- création d'un fichier texte pour enregistrer le nom du laboratoire utilisateur, pour une inscription sur la fiche "résultat" ;
- affichage écran des valeurs des deux températures : consigne et réelle ;
- possibilité de visualiser les valeurs en tension ou converties (décimales) de la transmission et de la conductance.

## **2.4. Evolution du cahier des charges au cours de l'élaboration de la version industrialisable**

Le cahier des charges permet de définir les principaux objectifs, mais pendant la phase de réalisation et conception certains autres choix ou autres modifications s'imposent. Le souci majeur restant l'optimisation et la fiabilité de l'appareil, les tests de fonctionnalité pratiqués au fur et à mesure permettent d'ajuster et de modifier certains points.

Par exemple, après des essais de régulation de température avec des composants électroniques de puissance, il s'est avéré que pour une régulation optimale seul un régulateur du type PID (critères de proportionnalité, d'intégration et de dérivé) géré par un microcontrôleur permet d'asservir rapidement le système de chauffage à la température choisie (habituellement à 37°C).

La réalisation du capot se fera par une société spécialisée en plasturgie, pour donner un design en adéquation avec les produits commercialisés actuellement, d'un poids réduit et d'un coût, après financement du moule, amoindri.

### 3. CONCEPTION ET REALISATION DES PIÈCES MECANIQUES

La démarche a consisté à conserver les dessins des pièces qui n'ont à subir aucune modification, à supprimer certaines, à modifier d'autres et à créer les nouvelles afin de répondre au cahier des charges. La présentation des dessins mécaniques, des vues d'ensemble et de montage est proposée sur un format A4 pour faciliter leur exploitation et leur impression.

Une mise à jour continue pendant toute la phase de transfert industriel a permis d'aboutir à un dossier mécanique complet. La nomenclature fait état de 58 dessins différents (pour 66 pièces), complétés des recommandations de fixation (emplacement et vis). De nombreuses vues d'ensemble (exemple fig 64) fournissent une aide au montage (avec réglages éventuels).

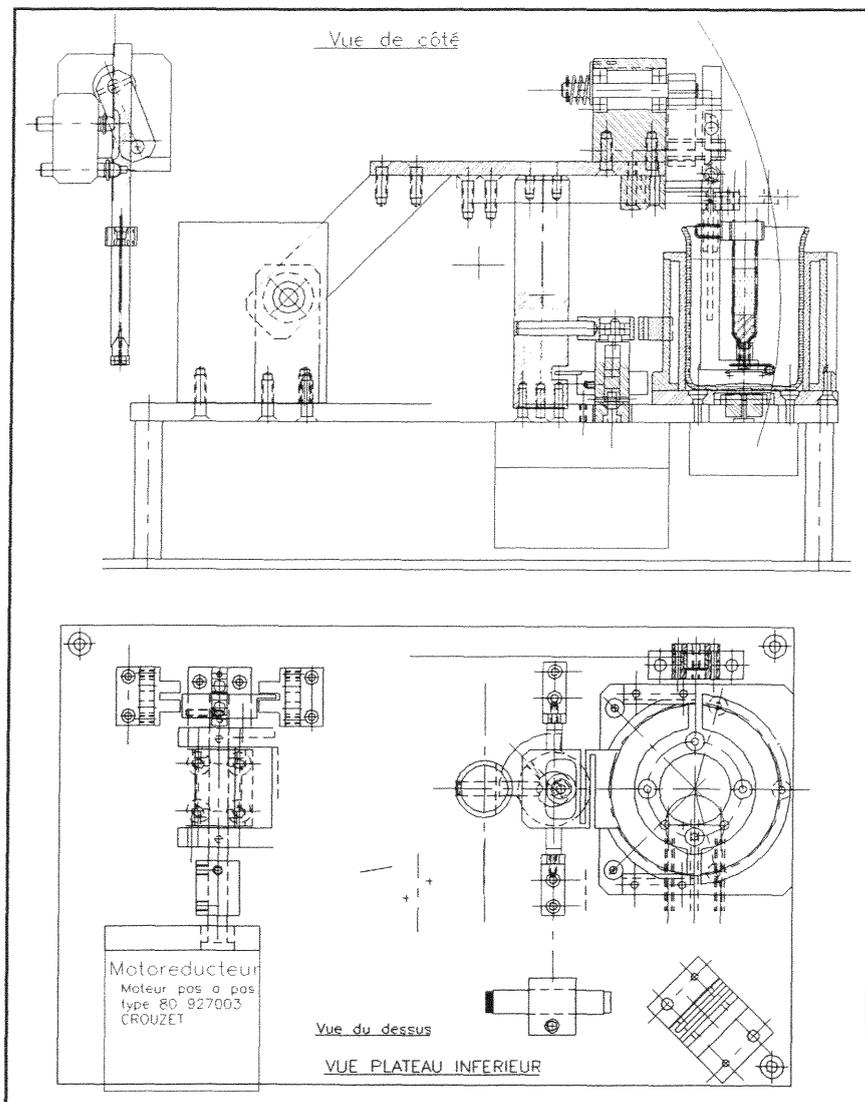


Figure 64 : exemple de vue d'ensemble pour le montage du Fragilimètre version industrielle.

## **4. CONCEPTION ET REALISATION DES CARTES ELECTRONIQUES**

Après les tests habituels sur "plaquette" d'essai afin de vérifier le bon fonctionnement de chaque structure, les différents schémas électroniques ont été réalisés sur un logiciel spécifique.

Une première carte permet la gestion des moteurs pas à pas, ainsi que le traitement des signaux de conductance et de transmission lumineuse.

La deuxième se compose d'une sécurité pour éviter une surchauffe au niveau des ceintures thermiques. Un rangement ou rack accueille l'ensemble : alimentations et cartes réalisées, au format Europe.

Toutes les cartes sont reliées à une carte "fond de panier" qui réalise l'interconnexion entre les divers organes. Cette carte est composée de multiples connecteurs assurant les communications électriques, électroniques et informatiques entre les capteurs (de position, photocellule, sondes de conductance, sondes de températures), le régulateur de température, la diode laser, les résistances de puissance (système de chauffage), les moteurs pas à pas, la carte d'interface entre l'appareil et l'ordinateur, ... .

Chaque module de traitement de l'information (transmission lumineuse et conductance) est équipé de résistances variables afin de régler, d'affiner la sensibilité des mesures et de limiter l'amplitude des signaux à une échelle 0-5 v. Des filtres du second ordre permettent d'éliminer entre autre la fréquence parasite du secteur (50 Hz).

Même si l'électronique (cartes et câblage) est dissimulé à l'intérieur du coffret, cette dernière doit être "propre" pour satisfaire une esthétique d'ensemble et ainsi faciliter un dépannage éventuel.

Toutes les données : composants, schémas électroniques, typons, schémas d'implantation, schémas de perçage, protocole de réglage, câblage sont fournis dans le dossier technique.

## 5. LOGICIEL INFORMATIQUE

Le fragilimètre est entièrement géré à partir d'une unité informatique (PC de type Pentium). Des programmes écrits en langage de programmation Turbo C++ composent le logiciel. Une carte interface PC-ADC12B8V/D de chez Digimétrie permet d'acquérir et de convertir les tensions analogiques 0-5 v (système interne de synchronisation par Timer pour un échantillonnage précis), de gérer les signaux numériques et de commander des tensions de sortie analogiques (0-5 v).

Le logiciel informatique est destiné :

- à l'automatisation de l'appareil (commande des divers moteurs, action sur la régulation) ;
- à la gestion de l'interface graphique (écran), du clavier et de la souris (éléments de communication entre l'utilisateur et le programme) ;
- à l'exécution de la procédure d'étalonnage des sondes de conductance ;
- à la réalisation des mesures (acquisition des données) ;
- aux traitements, aux calculs, à l'affichage des résultats ;
- à la sauvegarde des fichiers de données pour chaque mesure (avec un système d'archivage conçu pour permettre une recherche rapide d'anciens fichiers).



Figure 65 : fenêtre graphique affichée sur l'écran de l'ordinateur proposant le menu principal des différentes actions envisageables (commande de l'automatisation, mesures, traitements, sauvegardes, ...).

Tous ces modules sont proposés à l'utilisateur, et sont en quelque sorte regroupés sur la figure 65 (la fenêtre écran, qui affiche les différents choix, est en attente d'un retour d'information de l'utilisateur par l'intermédiaire soit du clavier numérique soit de la souris).

Les principales modifications informatiques vis à vis du logiciel initial (prototype) sont induites par :

- la commande des moteurs pas à pas ;
- l'utilisation d'une nouvelle carte d'acquisition (Digimétrie) ;
- la gestion de la température de consigne directement par l'ordinateur ;
- la gestion de la souris, ajoutée aux programmes initiaux afin de proposer à l'utilisateur un deuxième moyen de communication ;
- les modifications souhaitées au niveau des résultats édités ;
- la création d'un fichier complémentaire permettant l'enregistrement, lors de l'installation sur site, des informations sur le laboratoire et l'affichage de ces caractéristiques (nom, voire adresse) sur la fiche de résultats ;
- la possibilité de visualiser en direct l'information transmission ou conductance afin de vérifier ces signaux (maintenance) ;
- l'amélioration de la page graphique pour l'étalonnage des sondes de conductance ;
- l'affichage sur la fiche résultats de l'heure du début de mesure ;
- l'option concernant l'ajustement du temps de mesure ;
- les modifications quant aux procédures de sauvegarde après mesure.

remarque : des modifications quant au système de numérotation des fichiers de sauvegarde sont réalisées pour ne pas confondre les mesures effectuées sur des hématies et sur des plaquettes

L'illustration de ces modifications est proposée par le développement succinct de deux exemples.

① Le menu principal (fig 65) propose désormais en rubrique 3 le réglage de certains paramètres (fig 66).

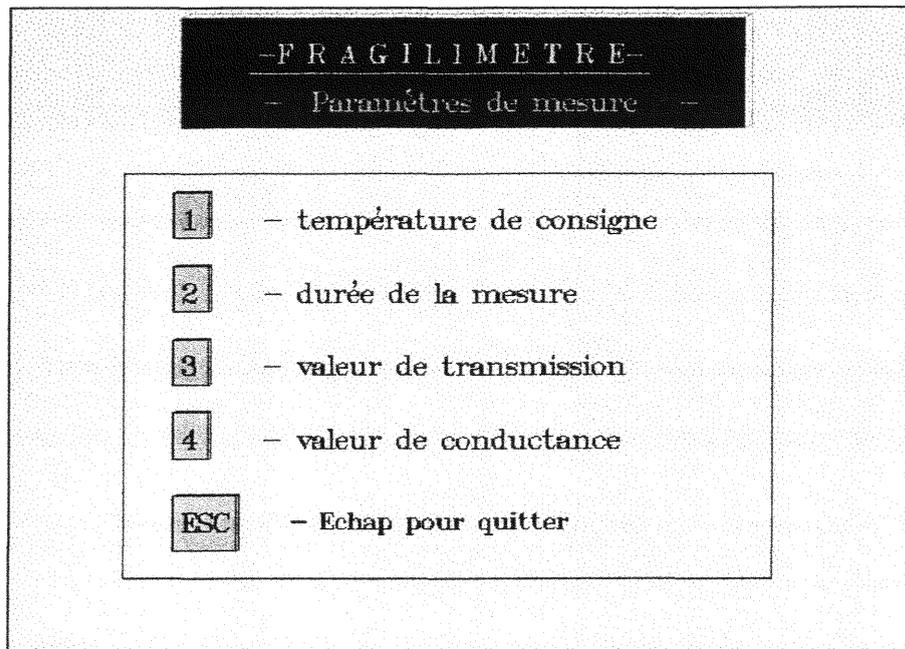


Figure 66 : fenêtre graphique affichée si l'utilisateur désire intervenir sur les paramètres de mesure.

Ce système de dialogue avec ouverture de fenêtre graphique permet une démarche souple et facile d'utilisation. A chaque instant, le retour au menu initial est proposé. Pour les paramètres de mesure, les deux premières rubriques (1 - 2) imposent ensuite un choix de valeur (température de consigne désirée, durée de la mesure). Les rubriques 3 et 4 permettent une lecture et un affichage, tous deux en continu, des valeurs de transmission (fig 67) ou de conductance.

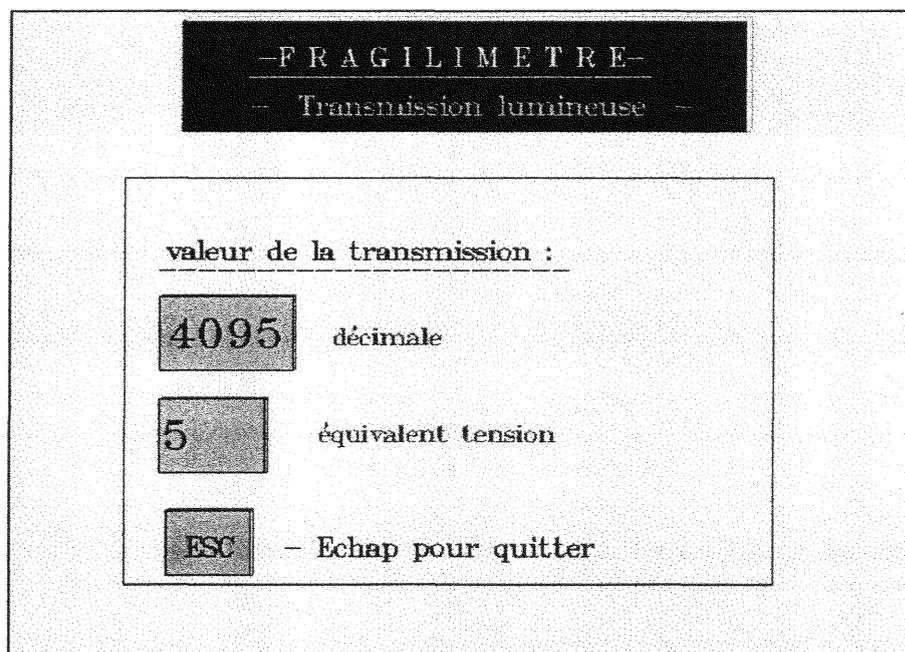


Figure 67 : fenêtre graphique proposée pour visualiser les valeurs en continu du paramètre intensité de transmission lumineuse captée.

② L'élaboration d'un algorithme (fig 68) facilite la compréhension, la construction et l'assemblage des jeux d'instructions dans le programme de commande des moteurs pas à pas.

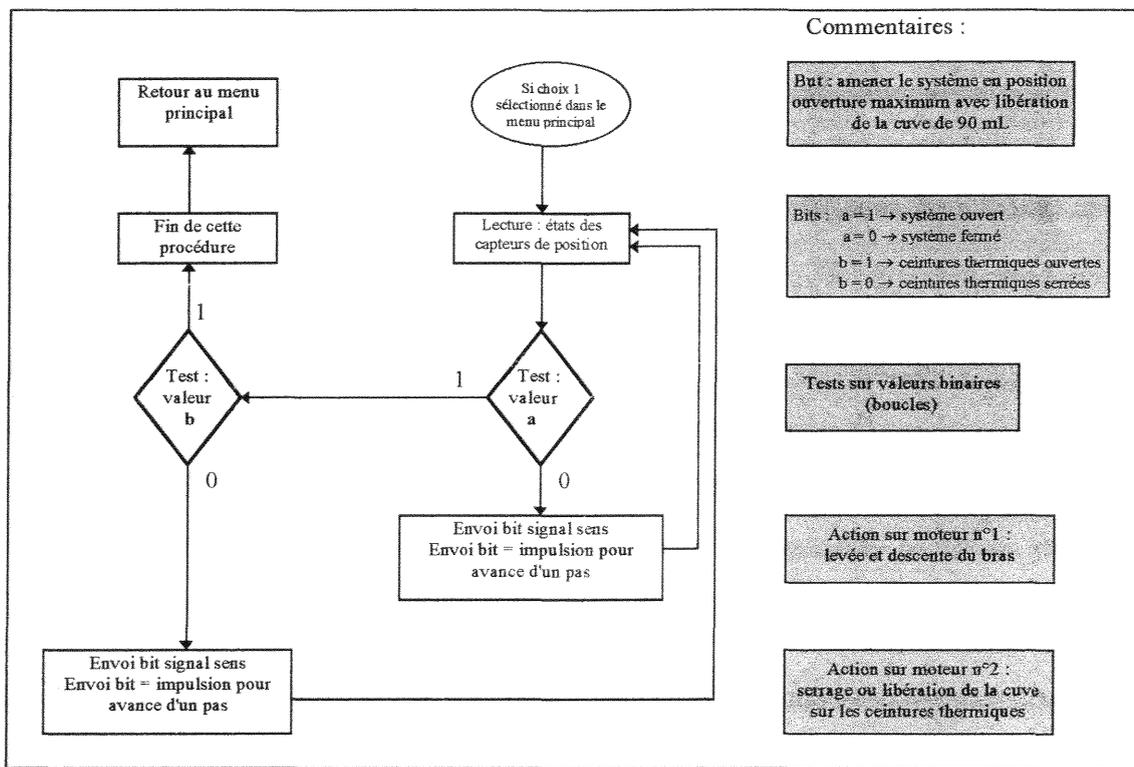


Figure 68 : algorithme de programmation pour la procédure de commande des moteurs pas à pas.

A la lecture de cet algorithme, les différentes phases de fonctionnement des moteurs, suivant les informations fournies par les capteurs de position, sont définies. Les capteurs optoélectroniques délivrent une information binaire correspondant à la présence ou non de chaque partie mobile à son niveau. Le mouvement des deux structures : plateau supérieur support du porte échantillon et demi-ceinture thermique, s'effectue par pas et n'est autorisé qu'après validation des tests sur les valeurs binaires acquises. L'avance ou la rotation est ainsi commandée par des instructions informatiques regroupées dans une "boucle". La sortie d'une boucle (arrêt du mouvement) est effective dès que le test est positif (valeur binaire = 1).

## 6. BILAN DU TRANSFERT INDUSTRIEL

Le transfert industriel reste l'objectif majeur pour un produit développé dans un laboratoire de recherche. Il engendre une valorisation (de l'équipe, du laboratoire, de l'entreprise, de la région) et par sa commercialisation future un retour de capital.

L'effort réalisé pendant ces quelques années de recherche et de conception a permis de finaliser un appareil automatique de mesure de la fragilité osmotique d'éléments figurés du sang : le Fragilimètre.

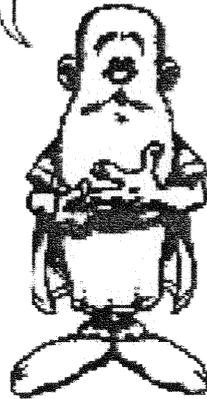
La première version qui sera prochainement commercialisée sera destinée au suivi de l'hémolyse des hématies soumises à une contrainte hypotonique progressive induite par dialyse lente. Une seconde phase, après validation des travaux effectués sur le comportement osmotique des plaquettes, permettra de proposer également le Fragilimètre comme outil de test de fragilité plaquettaire. La possibilité, désormais, de pratiquer également le test dit "réponse au choc hypotonique" complétera le champ des applications.

Ce transfert industriel par la conception de deux nouveaux appareils et du dossier technique complet (dessins mécaniques, schémas électroniques, programmes informatiques, explications) est arrivé à son terme. Certains aspects ont facilité ce travail :

- un prototype initial dans une version préindustrialisé, fiable, fonctionnel et déjà utilisé en routine (permettant d'analyser certaines contraintes, de tenir compte des premières critiques, ...)
- un dossier technique et scientifique précis (prototype) ;
- la mise à disposition de matériel (informatique, logiciels, outils, instruments de mesure) ;
- des réunions de travail constructives entre les différents collaborateurs pour ce projet ;
- ...

Le transfert industriel du Fragilimètre a concerné de nombreux domaines (mécanique, électronique, optique et informatique). Il a été une source continue d'expériences et d'enrichissements techniques. Enfin c'est un projet qui a permis de naviguer entre le secteur privé (contraintes industrielles, nécessité de résultats : appareil, ...) et un laboratoire de recherche (études, publications, ...).

En  
Conclusion  
...



*Conclusion  
Générale  
Perspectives*

L'exploration du comportement osmotique des plaquettes a permis de construire une approche théorique et expérimentale sur les variations d'intensité lumineuse observées à travers une suspension de plaquettes soumises à des variations de pression osmotique.

Les premiers résultats de la réponse osmotique des plaquettes, obtenus sur le Fragilimètre, laissent présager d'un intérêt certain pour ce test. La possibilité d'évaluer la viabilité des concentrés plaquettaires est déjà une facette importante. La caractérisation des procédures d'isolement de ces cellules, des matériaux plastiques utilisés (poches), de la température de conservation, de l'agitation lente, ... s'en trouve plus aisée.

L'utilisation du "Fragilimètre" avec ses différentes adaptations, pour le suivi de la viabilité des cellules par le test en dialyse lente et le test RCH, associée à un traitement informatique apporte des résultats fiables, précis et reproductibles. La gestion des données par un ordinateur autorise l'évolution des procédures de calcul et d'édition des résultats. De plus, les données issues de l'utilisation d'une seconde source lumineuse excitatrice (longueur d'onde différente), du recueil de la diffusion à un angle déterminé (par la mise en place d'une deuxième photodetecteur), ..., pourraient offrir des possibilités de calcul et de caractérisation de la géométrie des cellules pendant les mesures.

Une approche plus précise des caractéristiques physiologiques de la plaquette (changement de forme, augmentation de volume, lyse, agrégation spontanée, ...) au cours de la décroissance de la force ionique, doit être menée. Le dosage des marqueurs de lyse (sérotonine,  $\beta$ TG, ...) devrait, par exemple, signifier la présence ou non d'une lyse cellulaire. La quantification des glycoprotéines membranaires (GpIIb/IIIa, GpIb) et de la P-

sélectine soluble devrait permettre d'approcher l'état d'activation des plaquettes. Une recherche de la présence de microvésicules pourrait être tentée. Enfin une procédure de visualisation par microscopie optique avec du matériel adéquat et optimisé, serait la technique idéale pour prouver et illustrer l'évolution géométrique des plaquettes.

L'analyse de tous ces résultats conduira à l'optimisation du traitement des données fournies par le Fragilimètre, et permettra de définir les paramètres utiles aux diagnostics de certaines maladies liées à des anomalies membranaires de la plaquette et principalement de proposer les critères nécessaires au contrôle de qualité des concentrés plaquettaires conservés.

Les résultats seront alors sensibles à l'âge des plaquettes, à leurs possibles altérations membranaires, à leurs caractéristiques propres d'élasticité membranaire, ..., et certainement de façon générale à leurs propriétés rhéologiques.

Ces différents résultats complémentaires renforceront la fiabilité de ce test, et ouvriront les portes de la validation biologique dans un premier temps, puis comme pour le suivi de la fragilité des hématies, un marché commercial international par sa future standardisation.

L'intérêt de disposer rapidement de tests fiables et routiniers s'intensifie. Le nombre des publications récentes traitant de l'évaluation de la viabilité des concentrés plaquettaires par différentes techniques en témoigne (41').

Cet enthousiasme est renforcé par les possibilités d'analyses supplémentaires dont pourrait disposer le Fragilimètre. En effet ce dispositif de mesure, basé sur l'analyse d'une variation de transmission lumineuse à travers des suspensions cellulaires, pourrait permettre d'autres tests comme l'agrégation plaquettaire.

De plus, le test de fragilité osmotique peut s'adresser à d'autres particules ou cellules biologiques : spermatozoïdes (109,110), lymphocytes (111), cellules épithéliales de glande mammaire de rats (112), ... . Le Fragilimètre peut se révéler un outil d'analyse très intéressant pour suivre un gonflement osmotique de nombreux corps cellulaires et ainsi permettre l'évaluation des caractéristiques de leurs membranes respectives, donc de leur viabilité.

Même si la majorité des techniques de diagnostic, pratiquées sur le plan médical, ne font pas toujours la preuve du phénomène physique et biologique mesuré, les informations recueillies par leur bonne interprétation permettent d'établir des seuils caractéristiques de distinction pathologique.

Le Fragilimètre, dans sa version de base, propose un test rapide et entièrement automatique de mesure en routine de la fragilité des hématies par le suivi de l'hémolyse. La commercialisation de cet appareil s'effectuera dès la fin de la procédure de validation biologique, obligatoire entre différents laboratoires. Une seconde licence pour l'application aux plaquettes sanguines est signée entre l' Université Henri POINCARÉ et la société REGULEST.

La réalisation du transfert industriel par l'élaboration du dossier technique, complétée par la conception de deux appareils, a représenté forcément un temps de travail conséquent mais il a contribué à une valorisation de mes compétences technologiques.

# *Références*

# *Bibliographiques*

## Références Bibliographiques :

1. BONEU B., CAZENAVE J.P. Hémostase primaire, chap 1, In : Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose, 2<sup>ème</sup> édition, Reims : Boehringer Ingelheim, 1997 - pp 16-40.
2. LORD-DUBE H., L'ITALIEN R. Le thrombocyte, chap 7, In : Hématologie, Paris : Maloine éditeur, 1983 - pp 109-116.
3. JOBIN F., L'hémostase normale, chap 1, Production vie et mort physiologiques des plaquettes, chap 6, In : L'hémostase, Paris : Ed. Maloine, 1995 - pp 3-15, pp 215-225. (les presses de l'université Laval)
4. MASSE M., Qualité des produits plaquettaires : méthodes actuelles d'exploration in vitro, Transf. Clin. Biol. 1995 ; 2 : 79-84.
5. SWENEY J.D., HOLME S., MORAFF G., Storage of apheresis platelet after gamma irradiation. Transfusion 1994 ; 34 : 779-783.
6. BOERI N., SALEUN S., PELISSIER E., et al., Influence of a 12 hour, 22°C holding period for buffy coats on the preparation of platelet concentrates stored in plasma. Transfusion 1994 ; 34 : 881-886.
7. JOUSTRA-DIJKHUIS A.M., BOOMGAARD M.N., et al., Effect of filtration on subsequently stored platelet concentrates. Vox Sang 1994 ; 67, 1 : 22-27.
8. SWEENEY J.D., HOLME S., et al., In vitro and in vivo effects of prestorage filtration of apheresis platelets. Transfusion 1995 ; 35 : 125-130.
9. RAO G.H.R., ESCOLAR G., WHITE J.G., Biochemistry, physiology and function of platelets stored as concentrates. Transfusion 1993 ; 33 : 766-778.
10. BOOMGAARD M.N., JOUSTRA-DIJKHUIS A.M., COUVEROK C.W.N., et al., In vitro evaluation of platelet concentrates, prepared from pooled buffy coats, stored for 8 days after filtration. Transfusion 1994 ; 34 : 311-316.
11. DE WILDT-EGGEN J., SCHRIJVER J.G., et al., Improvement of platelet storage conditions by using polyolefin containers. Transfusion 1997 ; 37 : 476-481.
12. MURPHY S., KAHN R.A., HOLME S., et al., Improved storage of platelets for transfusion in a new container. Blood 1982 ; 60 : 194-200.
13. HOLME S., Platelet storage in a liquid environment. Transfusion Science 1994 ; 15 : 117-130.
14. LEON G., SORE A., LINARES J., et al., Preservation of blood platelets concentrates at different temperatures. Acta Cient Venez 1990 ; 41 : 43-49.
15. HOLME S., SAWYER S., et al., Studies on platelets exposed to or stored at temperatures below 20 degrees C or above 24 degrees C. Transfusion 1997 ; 37 : 5-11.

16. MITCHELL S.G., HAWKER R.J., et al., Effect of agitation on the quality of platelet concentrates. *Vox Sang* 1994 ; 67 : 160-165.
17. BUCHHOLLZ D.H., AUBUCHON J.P., et al., Effects of white cell reduction on the resistance of blood components to bacterial multiplication. *Transfusion* 1994 ; 34 : 852-857.
18. SCHOONEMAN F., Groupe PSL, La filtration des concentrés plaquettaires Aspects techniques, résultats quantitatifs. *Rev. Fr. Transfus. Hémobiol.* 1993 ; 36 : 253-264.
19. STACK G., SNYDER E.L., Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1994 ; 34 : 20-25.
20. BORN G.V.R., The aggregation of blood platelets. *J. Physiol. (London)* 1963 ; 147 : 178-195.
21. NURDEN P., DURRIEU-JAIS C., NURDEN A., Applications cliniques actuelles d'une activation plaquettaire par cytométrie en flux, *Sang Thrombose Vaisseaux* 1997 ; 9 : 441-448.
22. MAUPIN B., ROBERT F., CHATAING B., Criteria for platelet viability, *Platelets* 1976 ; 30 : 447-456.
23. MURPHY S., REBULLA P., et al., In vitro assessment of the quality of stored platelet concentrates. *Transfusion Medicine Reviews* 1994 ; 8 : 29-36.
24. BERTOLINI F., MURPHY S., A multicenter inspection of the swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. *Transfusion* 1996 ; 36 : 128-132.
25. FRANTONI J.C., POINDEXTER B.J., BONNER R.F., Quantitative assessment of platelet morphology by light scattering : a potential method for the evaluation of platelets transfusion. *J. Lab Clin. Med.* 1984 ; 103 : 620-631.
26. GEORGE V., HOLME S., MOROFF G., Evaluatiuon of two instruments for non invasive platelet concentrate quality assessment, *Transfusion* 1989 ; 29 : 273-275.
27. KUNICKI T.J., TUCCELLI M., BECKER G.A., et al., A study of variables affecting the quality of platelets stored at "room temperature". *Transfusion* 1975 ; 15 : 14-21.
28. MITROVIC S., MITROVIC D., et al., A simple morphological score for the quality control of platelet concentrates. *Haematologia (Budap)* 1997 ; 28 : 239-246.
29. FARRUGIA A., Platelet size analysis in the quality assurance of platelet concentrates for transfusion. *Clin. Lab. Haem.* 1995 ; 17 : 51-55.
30. BENN H.P., GANSCHOW I., Active uptake of serotonin as viability parameter of stored platelets. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed* 1994 ; 32 : 84-87.
31. JAREMO P., Computerised method for monitoring stored platelet packs. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1988 ; 26 : 193-198.

32. JAREMO P, Some correlations between light transmission changes and some commonly used in vitro assays for the assessment of platelet concentrates. *Eur. J. Haematol.* 1997 ; 58 : 181-185.
33. OLEF L.R., The rate of disintegration of platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 1936 ; 22 : 128-134.
34. GRAM C.N., LOUS P., Sur la résistance des thrombocytes. *Nordisk Med.*, 1939, 1, 162 (Cité par MAUPIN B., *Les plaquettes Sanguines de l'homme*. Paris, Masson Cie, 1954)
35. MUHRER M.E., BOGART R., HOGAN A.G., Estimation of platelet fragility. *Am. J. Physiol.* 1944 ; 141 : 449-453.
36. DAY L.R., Platelet fragility in man. *P.S.E.B.M.* 1947 ; 64 : 109-111.
37. GUREVITCH J., NELKEN D., Osmotic fragility of human blood platelets. *Blood* 1956 ; 11 : 924-928.
38. GUREVITCH J., NELKEN D., DANON D., Osmotic fragility of human blood platelets : phase contrast and electron microscopic studies. *Blood* 1958 ; 13 : 773-777.
39. INTROZZI P., DE NICOLA P., Untersuchungen über die physiopathologie der blutplättchen. *Sci. Med. Italica Deutsch* 1956 ; 4 : 666-697.
40. BASERGA A., BALLERINI G., La résistance osmotique plaquettaire dans différentes conditions hématologiques. *Schweiz Med. Wochenschr.* 1957 ; 87 : 1218-1220.
41. ULUTIN O.N., KARACA M., A study on the pathogenesis of thrombopathia using the "platelet osmotic-resistance test". *Brit. J. Haemat.* 1959 ; 5 : 302-306.
- 41'. HOLMES, MOROFF G, MURPHY S. A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays : the test for extent of shape change and response to hypotonic shock. Biomedical Excellence for Safer Transfusion Working Party of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion* 1998 ; 38 : 31-40.
42. NELKEN D., GILBOA N., GUREVITCH J., Studies on osmotic fragility of human blood platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 1960 ; 56 : 120-126.
43. DANON D., GILBOA-GARBER N., NELKEN D., Reversible and irreversible changes in normal human thrombocyte membranes by slow and rapid swelling. *J. Cell. Compar. Physiol.* 1961 ; 7 : 21-28.
44. NELKEN D., GILBOA-GARBER N., GUREVITCH J., Studies on the osmotic fragility of human blood platelets. IV Reversible changes in platelets morphology. *Acta Haemat.* 1961 ; 6 : 75-80.
45. ROGNER G., Die bestimmung der osmotischen thrombozyten-resistenz mit dem elektrophotometer. *Acta Haemat.* 1963 ; 29 : 346-357.

46. FANTL P., Osmotic stability of blood platelets. *J. Physiol. (London)* 1968 ; 198 : 1-16.
47. ZAHAVI J., DANON D., DREYFUSS F., A method for automatic recording of the osmotic fragility of blood platelets. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1970 ; 23 : 182-188.
48. KIM B.K., BALDINI M.G., The osmotic platelet response as an indicator of platelet viability during storage (abstract). *Fed. Proc.* 1970 ; 29 : 717
49. KIM B.K., BALDINI M.G., The platelet response to hypotonic shock. Its value as an indicator of platelet viability after storage. *Transfusion* 1974 ; 14 : 130-138.
50. LUNBERG A., MERYMAN H.T., ESTWICK N., Response of human platelets to hyper and hypotonic media at 37 and -5°C. *Am. J. Physiol.* 1972 ; 222 : 1100-1106.
51. VIGNERON C., STOLTZ J.F., GOS G., STREIFF F., An attempt to standardize a test for platelet osmotic fragility. C.R. du symposium sur "the rôle of platelets in haemostasis and thrombosis" Prague 1971, *Acta Universitatis Carolinae* 1972 : 399-402.
52. KAHN R.A., MERYMAN H.T., Effects of various solutes on platelets exposed to hypertonic stress. *Am. J. Physiol.* 1973 ; 225 : 770-775.
53. HARDEMAN M.R., HEYNENS C.J.L., Storage of human blood platelets, The serotonin uptake and hypotonic shock response as in vitro viability tests. *Thrombos. Diathes. Haemorrh. (Stuttg)* 1974 ; 32 : 405-416.
54. ODINK J., Platelet preservation II, The response of human platelet suspensions to hypotonic stress. *Thrombos. Haemostas. (Stuttg.)* 1976 ; 36 : 182-191.
55. ODINK J., BRAND A., Platelet preservation V, Survival, serotonin uptake velocity, and response to hypotonic stress of fresh and cryopreserved human platelets. *Transfusion* 1977 ; 17 : 203-209.
56. SUMMERER M.H., GENCO P.V., KATZ A.J., The response of human platelets to hypotonic stress : direct measurement of volume change. *Ann. Clin. Lab. Sc.* 1978 ; 8 : 447-452.
57. LAW P., The tolerance of human platelets to osmotic stress. *Exp. Hematol.* 1983 ; 11 : 351-357.
58. WATANABE E., SASAKAWA S., Changes of platelet cell volumes in hypotonic solution. *Thromb. Research* 1983 ; 31 : 13-21.
59. ARMITAGE W.J., PARMAR N., HUNT C.J., The effects of osmotic stress on human platelets. *J. Cell. Physiol.* 1985 ; 123 : 241-248.
60. EGGER M., DONATH E., ZIEMER S., et al., Electrorotation - a new method for investigating membrane events during thrombocyte activation. Influence of drugs and osmotic pressure. *Biochem. Biophys. Acta* 1986 ; 861 : 122-130.
61. FARRUGIA A., HUGHES C., et al., Microtitre plate measurement of platelet response to hypotonic stress. *J. Clin. Pathol.* 1989 ; 42 : 1298-1301.

62. DAVIS W.P., GRAHAM P., The effect of hypotonicity on the mean platelet volume of patients with thrombo-embolism. *Clin. Lab. Haemat.* 1992 ; 14 : 307-314.
63. HANDIN R.I., FORTIER N.L., VALERI C.R., Platelet response to hypotonic stress storage at 4°C et 22°C. *Transfusion* 1970 ; 10 : 305-309.
64. JAISSE F., REVIRON J., Le test de reponse des plaquettes au choc osmotique-intérêt transfusionnel in : *Actualités Transfusionnelles : compte rendu du IX congrès National de Transfusion sanguine Nancy 30 mai-2 juin 1973*, ed. Streiff F., Masson Publ.(Paris) 1974 : 292-298
65. LECOMPTE J., ANGUE M., BAECHLE J.P., NEVEUX Y., CLERC Y., FABRE G., JOUSSEMET M., Conservation des plaquettes dans un nouveau type de matériel plastique, *Rev Fr Transf Immuno-hématol.* 1985 ; 18 : 69-89.
66. BRODTHAGEN U.A., ARMITAGE W.J., PAMAR N., Platelet cryopreservation with glycerol, dextran, and mannitol : recovery of 5-hydroxytryptamine uptake and hypotonic stress response. *Cryobiologie* 1985 ; 22 : 1-9.
67. KIM B.K., BALDINI M.J., Glycerol stress and platelet integrity, *Cryobiologie* 1986 ; 23 : 209-213.
68. SNYDER E.L., BEARDSLEY D.S., et al., Storage of platelet concentrates after high-dose ultraviolet B irradiation. *Transfusion* 1991 ; 31 : 491-496.
69. SHIMIZU T., SHIBATA K., KORA S., First autoclave-sterilized platelet additive solution containing glucose with a physiological pH for the preparation of Plasma-Poor Platelet concentrates. *Vox Sang* 1992 ; 62 : 87-93.
70. TURNER V.S., HAWKER R.J., MITCHELL S.G., MEAD A.M.S., Paired in vivo and in vitro comparaison of apheresis and "recovered" platelet concentrates stored for 5 days. *J. Clin. Apheresis* 1994 ; 9 : 189-194.
71. KOERNER K., SAHLMEN, ZIMMERMANN B., CARDOSO M., KUBANEK B., In vitro platelet function during storage in three different additive solutions. *Vox Sang* 1994 ; 67 : 154-159.
- 71'. DIETERLEN A., JUNG G., SCHULTZ G., L'exploration des fonctions plaquettaires à l'aide du 4X Rhéoagregometer-Laser. *Innov. Techn. Biol. Med.* 1995 ; 16 : 585-596.
72. FARRUGIA A., Platelet size analysis in the quality assurance of platelet concentrates for transfusion. *Clin. Lab. Haem.* 1995 ; 17 : 51-55.
73. MROWIEG Z.R., OLEKSOWISZ L., DUTCHER I.P., DE LEON-FERNANDEZ M., LALEZARI F., PUSSZKIN G., A novel technique for preparing improved buffy coat platelet concentrates. *Blood Cells-Molecules and Diseases* 1995 ; 21 : 25-33.
74. MASSE M., Qualité des produits plaquettaires : methodes actuelles d'exploration in vitro. *Transf. Clin. Biol.* 1995 ; 2 : 79-84.

75. KOERNER K., WEIHE R., et al., Quality of pooled platelet concentrates prepared from buffy coats and stored in an additive solution after filtration. *Ann. Hematol.* 1995 ; 70 : 97-102.
76. JUNG G., DIETERLEN A., GUERIN E., BRUNOT A., SELVA J., SCHULTZ G., Size and shape change behaviour of platelets during storage in response to hypotonic shock. *Vox Sang* 1996 ; 70 : 50-52.
77. DIDELON J., GIGOUT T., DUMAS D., HUMBERT J.C., GAUCHOIS G., GENTILS M., STOLTZ J.F., Conception d'un appareil automatique de mesure de la fragilité osmotique de l'hématie par dialyse lente. *Innovation et Technologie en Biologie et Médecine* 1996 ; 17 : 337-351.
78. SHECHTER E., Transport de l'eau, chap 8, In : *Membranes biologiques, structure transports bioénergétiques*, Paris : Masson ed.(221p), 1984 - pp 98-102.
79. BERGER M., LAHNECHE B., Osmose et pression osmotique, chap VI, In : *Biophysique médicale (Tome I : Physico-chimie)*, Paris : Baillières & Fils Ed., 1969 - pp 109-132.
80. VANDER A.J., SHERMAN J.H., LUCIANO D.S., BRIERE R., Structure cellulaire, chap 3, mouvements des molécules à travers les membranes cellulaires, chap 6, In : *Physiologie humaine, 3<sup>ème</sup> édition*, Montréal : Chenelière/McGraw-Hill ed., 1995 - pp 39-41, pp 109-134.
81. WEBSTER H.L., Osmolality of fluids, In *Biotechnology : Application and Research*, Edited by Cheremisinoff P.N., Ouelette R.P., (Technomic Publishing, USA) 1985 - pp 607-622.
82. GUINAND S., TONNELAT J., Sur l'étude expérimentale des solutions macromoléculaires par diffusion de la lumière. *J Chim Phys* 1952 ; 49 : 481-499.
83. EDSALL J.T., DANDLIKER W.B., Light scattering in solutions of proteins and other large molecules. *Fortschr Chem Forsch* 1951 ; 2 : 1-56.
84. PUTZEYS P., BROSTEAUX J., The scattering of light in protein solutions. *Trans Faraday Soc* 1935 ; 31 : 1314-1325.
85. STOLTZ J.F., BATOZ J.F., Application de la diffusion de la lumière à l'étude du volume plaquettaire. *Acta Haem.* 1974 ; 52 : 294-302.
86. LATIMER P., MOORE D.M., BRYANT D., Changes in total light scattering and absorption caused by changes in particle conformation. *J Theoret Biol* 1968 ; 21 : 348-367.
87. LATIMER P., The influence of photometer design on optical-conformation changes. *J theor Biol* 1975 ; 51 : 1-12.
88. LATIMER P., Transmittance : an index to shape changes of blood platelets. *Applied Optics* 1975 ; 14 : 2324-2326.

89. LATIMER P., BORN G.V.R., MICHAL F., Application of light scattering theory to the optical effects associated with the morphology of blood platelets. Arch Biochem Biophys 1977 ; 180 : 151-159.
90. FROJMOVIC M.M., PANJWANI R., Blood cell structure-function studies : light transmission and attenuation coefficients of suspensions of blood cells and model particles at rest and with stirring. J Lab Clin Med 1975 ; 86 : 326-343.
91. HOLME S., SIMMONDS M., BALLEK R., MURPHY S., Comparative measurements of platelet size by Coulter Counter, microscopy of blood smears, and light-transmission studies. J Lab Clin Med 1981 ; 97 : 610-622.
- 91'. DIETERLEN A., Instrumentation associée à l'étude de l'agrégation des plaquettes sanguines in vitro : changement de forme et taille des agrégats. 146p, Th. : Electronique-Electrotechnique-Automatique : Mulhouse : 1991 ; 91 MULH 0204.
92. RAYLEIGH X.X., The incidence of light upon a transparent sphere of dimension comparable with the wave length. Proc. Roy. Soc. 1910 ; 84 : 25-46.
93. GANS R., Strahlungsdiagramme ultramikroskopischer Teilchen. Ann Physik 1925 ; 76 : 29-38.
94. MIE G., Beiträge zur Optik trüber Medien, spezirll kolloidaler Metallösungen. Ann Physik 1908 ; 25 : 377-445.
95. DEBYE P., Molecular weight determination by light scattering. J Phys Colloid Chem 1947 ; 51 : 18-31.
96. VAN DE HULST H. C., Light scattering by small particles. Ed Wiley J. and Sons (New York) 1957, pp 21,28,85,107,127,172,270.
- 96'. DIDELON J., Conception et réalisation d'un appareil de mesure de la résistance osmotique de la membrane de l'hématie. 215 p. Diplôme de thèse : Génie Biologique : Nancy (I.N.P.L.): 1995 ; N°
97. COURRIERE P., Abrégés : Physique et Biophysique Pharmaceutique, n°1 : électricité magnétisme optique, , chap 3 : courant dans les électrolytes, Masson ed. 1990 - pp 31-47.
98. ARNAUD F., GOODRICH R.P., Measurement of transmitted light asPhysique et biophysique pharmaceutiques, 1 : électricité - magnétisme optique 1990, ed. an indicator of cryopreserved platelet viability. Haemostasis 1996 ; 26 : 107-116.
99. FROJMOVIC M., WONG T., The platelet extinction coefficient measured by aggregometry is dependent on platelet composition rather than size : Implications for studies of platelet heterogeneity and abnormalities. Thromb Haemost 1990 ; 64 : 582-588.
100. MEYER M.M., VERKMAN A.S., Human platelet osmotic water and nonelectrolyte transport. Am J Physiol 1986 ; 251 : 549-557.
101. WONG K.R., VERKMAN A.S., Human platelet diffusional water permeability measured by nuclear magnetic resonance. Am J Physiol 1987 ; 252 : 618-622.

102. LIVNE A., GRINSTEIN S., ROTHSTEIN A., Volume-regulating behavior of human platelets. *J Cell Physiol* 1987 ; 131 : 354-363.
103. FROJMOVIC M.M., WONG T., WHITE J.G., Platelet plasma membrane is equally distributed between surface and osmotically-evaginable surface-connecting membrane, independent of size, subpopulation or species. *Nouv Rev Hematol* 1992 ; 34 : 99-110.
104. MARGALIT A., SOFER Y., GROSSMAN S., et al., Hepoxilin A<sub>3</sub> is the endogenous lipid mediator opposing hypotonic swelling of intact human platelets. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1993 ; 90 : 2589-2592.
105. MARGALIT A., GILUTZ H., GRANOT Y., Low regulatory volume decrease rate in platelets from Ischemic patients : a possible rôle for hepoxilin A<sub>3</sub> in thrombogenicity. *Platelets* 1995; 6 : 371-376.
106. WHITE J.G. Effects of EDTA on platelets structure. *Scand J Haemat* 1968 ; 5 : 241-54.
107. GIGOUT T., DIDELON J., LATGER V., CLAISE C., SCHOONEMAN F., PAULUS F., STOLTZ J.F., Development of a new automatic test to study platelet response to osmotic pressure variation : application to concentrates viability evaluation. *Transf Clin Biol*, sous presse.
108. VIGNERON C., STOLTZ J.F., ALEXANDRE P., STREIFF F. Etude du comportement osmotique des plaquettes humaines. *BioMedicine* 1975 ; 23 : 210-213.
109. SMIKE CB., TUREK PJ., Hypo-osmotic swelling can accurately assess the viability of nonmotile sperm. *Mol Reprod Dev* 1997 ; 47 : 200-203.
110. VERHEYEN G., JORIS H., CRITS K., NAGY Z., TOURNAYE H., VAN STEIRTEGHEM A., Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod Update* 1997 ; 3 : 195-203.
111. GRINSTEIN S., ROTHSTEIN A., SARKADI B., GELFAND E.W., Responses of lymphocytes to anisotonic media : volume regulating behavior. *Am J Physiol* 1984 ; 246 : 204-215.
112. CALVERT DT., SHENNAN DB., Volume-activated taurine efflux from the in situ perfused lactating rat mammary gland. *Acta Physiol Scand* 1998 ; 162 : 97-105.

Nom : GIGOUT

Prénom : Thierry

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

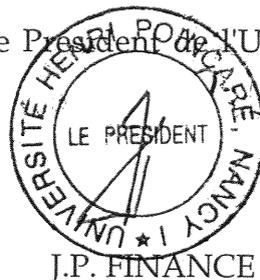
en BIOLOGIE ET SANTÉ

Spécialité : GÉNIE BIOLOGIQUE ET MÉDICAL

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 20 octobre 1998 n° 75

Le Président de l'Université





## **Study of human platelet osmotic behavior**

Development and evaluation of an automated test to measure the platelets response to osmotic pressure variation

Studying the osmotic resistance or swelling of platelets has often been suggested as a test to assess the viability of this cell. This evaluation is particular interest to enrich the rheological understandings, to diagnose eventually membrane anomalies and principally to insert it in platelet concentrates quality control before transfusion. A number of authors have analysed the behaviour of platelets in hypotonic media by a variety of complementary methods (cell count, morphology, determinations of substances released, ...). Most studies are currently based on the so-called "hypotonic shock response" test (HSR). Yet any platelet viability evaluation technique is standardised, used in reference or does correspond with proper instrumentation.

In this study, we describe an automated test using slow dialysis to assess platelet osmotic resistance. The "Fragilimeter", device used routinely to characterise RBC fragility, has been adapted to the study of platelet osmotic behaviour. The variation in light transmission through a platelet suspension according to NaCl concentration are linked to the change in cellular volume (lysis) and so characterise viability of the cells. This interpretation was dealt with a theoretical approach of platelet optical properties completed by a system response analysis. The results obtained with normal platelets revealed the good reproducibility and sensibility of the technique and the influence to the measures of several parameters : anticoagulant (citrate, EDTA), cellular concentration and temperature. The test was applied to the platelet concentrates quality control for transfusion.

This measure device associated with a processing unit permit adaptations for others applications, as HSR test (indeed future platelet aggregation tests), and software evolution for treatment data. Finally the osmotic fragility test can be applied to other particles or biological cells : spermatozoas, lymphocytes, ...

The response of different executed tests with Fragilimeter, confirmed by a biological validation, permit to complete measure scale actually operational with this commercialised apparatus.

## **SUIVI DU COMPORTEMENT OSMOTIQUE DES PLAQUETTES SANGUINES**

Développement et évaluation d'un test automatique de mesure de la réponse des plaquettes à des variations de pression osmotique.

L'étude de la résistance ou du gonflement osmotique de la plaquette sanguine a souvent été proposée comme test d'approche de sa viabilité. Cette évaluation est d'un intérêt particulier pour enrichir les connaissances rhéologiques de cette cellule, pour diagnostiquer d'éventuelles anomalies membranaires et principalement pour l'inclure dans le contrôle de qualité des concentrés plaquettaires avant transfusion. De nombreux auteurs ont analysé le comportement des plaquettes en milieu hypotonique par différentes approches complémentaires (numération, observation morphologique, dosage de substances libérées, agrégation photométrique, etc ...). Actuellement la majorité des tests cliniques s'appuie sur le test dit de "réponse au choc hypotonique" (RCH). Cependant aucune technique d'évaluation de la viabilité des plaquettes n'est standardisée, référencée ou n'a fait l'objet d'une instrumentation propre.

Dans ce travail, nous décrivons un test automatique d'approche par dialyse lente de la résistance osmotique des plaquettes. Le "Fragilimètre", appareil utilisé en routine pour caractériser la fragilité des érythrocytes, a été adapté pour l'étude du comportement osmotique des plaquettes. La variation de transmission lumineuse à travers la suspension plaquettaire en fonction de la concentration en chlorure de sodium est dépendante du changement de volume de la cellule (de sa lyse), et permet ainsi de caractériser la viabilité de la cellule. Cette interprétation a fait l'objet d'une approche théorique des propriétés optiques de la plaquette, complétée par une analyse de la réponse du système. Les résultats obtenus avec des plaquettes normales montrent une bonne sensibilité et reproductibilité de la méthode, ainsi que l'influence sur les mesures de plusieurs paramètres : anticoagulant (citrate, EDTA), concentration cellulaire et température. Le test a été appliqué au contrôle de qualité des concentrés plaquettaires conservés en vue de transfusion.

Ce dispositif de mesure, associé à une unité informatique, autorise des adaptations pour d'autres applications comme le test RCH, et des évolutions logicielles de traitements de données. Enfin, le test de fragilité osmotique peut s'adresser à d'autres particules ou cellules biologiques : spermatozoïdes, lymphocytes, ...

La réponse des différents tests effectués avec la Fragilimètre, confortée à une validation biologique, permet de compléter la gamme de mesures actuellement opérationnelle à l'aide de cet appareil commercialisé.

### Mots clés :

**Plaquettes, résistance osmotique, dialyse, transmission et diffusion lumineuse, viabilité.**

Spécialité : **"BIOLOGIE et SANTE"**

**UFR Sciences Médicales**

**Laboratoire d'Angiohématologie-Hémorhéologie**

Lemta - UMR CNRS 7563 et Equipe FR CNRS-UHP-INPL-CHU

Faculté de Médecine, Brabois, Bât. E, BP 184

54505 VANDOEUVRE - les - NANCY