

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Populaire et Démocratique Algérienne République

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Faculté des sciences de la nature et de la vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biochimie et Biologie cellulaire et Moléculaire

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre

N° desérie

Intitulé:

Etude de la fragilité membranaire des érythrocytes par la cytométrie en flux.

Présenté par: Bouderbala Randa

Le 18/06/2023

Aimar Aya Amira

Jury d'évaluation :

Encadreur 1: Moussaoui Samira (M.C.B -Université Frères Mentouri Constantine 1).

Encadreur 2 : Zouitene Raouf (M.C.B -Université Salah Boubnider, Constantine 3).

Présidente : Medoukali Imane (M.C.B -Université Frères Mentouri, Constantine1).

Examinatrice : Abed Nousseiba (M.C.A-Université Frères Mentouri, Constantine1).

Année universitaire 2022-2023

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu Allah le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce travail.

*Nos travaux ont été réalisés au sein du laboratoire d'hémobiologie et CTS de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine. Je tiens à exprimer à Monsieur le **M.C.B Zouitene Raouf**, directeur du laboratoire, ma profonde gratitude pour nous avoir accueillis au sein de son équipe.*

La confiance qu'il nous a accordée et ses encouragements nous ont beaucoup aidés à mener à terme le travail. Qu'il soit assuré de notre attachement.

*Madame **Moussaoui Samira**, Maître de conférences à l'université Frères mentouri Constantine 1, qui a assuré la direction scientifique de ce mémoire. Sa grande disponibilité a permis un suivi permanent du déroulement des travaux. Les discussions et les conseils qu'elle nous a prodigués nous ont été d'une très grande utilité. Un grand merci pour son humanité et son ouverture d'esprit qui nous ont aussi permis d'avancer dans ma vie personnelle. Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance.*

*Un grand merci aux membres de jury, **Dr Medoukali Imane** et **Abed Nousseiba** pour l'honneur qu'elles nous ont fait d'évaluer et de juger notre travail. Leurs remarques et suggestions ne feront que parfaire ce travail, Et enfin, nous souhaitons d'exprimer nos reconnaissances à toute personne ayant contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce travail.*

Dédicace

ToutlemerciàALLAHlepluspuissantetlemiséricordieuxpourlaforcequi nousadonnépouraccomplircemémoire.....

AmatrèschèremèreHafida

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme ilse doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présenceàmescotesatoujoursétémasourcedeforcepouraffronterles différentsobstacles.

Amoncher PèreMouhamedKamel

Cetravailstdédiéàmonpère, décèdetroptôt, quim'atoujours pousséet motivédansmesétudes.

Ameschèressœursetfrères

Bassma, wafa, Housseem et Hamza merci énormément pour ton soutienplus que précieux. Merci pour ton grand cœur toutes vos qualités qui neseraitpasaussimagiquesanstaprésenceet tonamour.

Amoncher Oussama

Mercipourvotreprésence,encouragementetpourtonamour.

A ma chère Binôme Amira, madame Moussaoui Samira et Dr ZouiteneRaoufpourtoutsoutienetencouragements.

Randa

Dédicace

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à dédier ce humble travail à :

À ma tendre mère SAMIRA et mon très cher père ABDELHAMID

Merci pour votre soutien et votre patience tout au long de ces années d'études

À mon frère et sa femme : Islam et Rayane

Merci énormément pour ton soutien plus que précieux. Merci pour ton grand cœur toutes vos qualités qui ne serait pas aussi magique sans ta présence et ton amour.

À ma binôme Randa, madame Moussaoui Samira et Dr Zouitene Raouf

Merci pour tous vos soutiens et encouragements.

À ma meilleure cousine : Maya

Merci de m'avoir supportée pendant si longtemps, Tu es aussi ma binôme de voyage.

Amira

Table des matières

Liste des

abréviations

Liste des figures

aux

Chapitre I: Fragilité membranaire des érythrocytes et du sang3

Partie I : Rappels sur les érythrocytes et la fragilité membranaire3

I.1. Définition des érythrocytes3

I.2. Morphologie3

I.3. Déformabilité des globules rouges4

I.4. Constituants des globules rouges5

I.4.1. Hémoglobine5

I.4.2. Membrane érythrocytaire6

I.4.3. Fragilité membranaire des érythrocytes7

a. Augmentation de la fragilité8

b. Diminution de la fragilité9

I.5. Erythropoïèse10

I.5.1. Définition10

I.5.2. Etapes de l'érythropoïèse10

I.6. Vieillesse des globules rouges et hémolyse11

Partie II: Rappels sur le don du sang13

II.1. Don du sang13

II.2. Etapes du don Error! Bookmark not defined.

II.3. Types de don13

II.4. Préparation des produits sanguins labiles13

II.5. Conservation des poches14

Chapitre II: Méthodes de détection de la fragilité de la membrane érythrocytaire

| | |
|---|----|
| | 15 |
| 1. Pinktest | 15 |
| 2. Testderésistanceglobulaire | 15 |
| 3. Cytométrie enflux | 16 |
| 3.1. Principe delaCMF..... | 17 |
| 3.2. SystèmesdelaCMF..... | 18 |
| 3.2.1. Systèmedefluidique | 18 |
| 3.2.2. Système optique | 19 |
| 3.2.3. Système électronique | 19 |
| 3.2.4. Systèmeinformatique | 19 |
| 4. ApplicationsdelaCMF | 20 |
| 4.1. Immunophénotypage | 20 |
| 4.2. Numérationdes cellulessousches circulantes | 21 |
| 4.3. Cycle cellulaireetlaCMF | 21 |
| 4.4. Numérationdes réticulocytes | 21 |
| 4.5. Tricellulaire | 22 |
| 5. IntérêtdelaCMF | 22 |
| 6. InconvénientsdeCMF | 22 |

Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| 1. Type etlieud'étude | 24 |
| 2. Echantillons | 24 |
| 2.1. Prélèvementdes témoins..... | 24 |
| 2.2. Pochesdeconcentréglobulaire | 24 |
| 3. Matériel | 25 |
| 4. Mode opératoire | 26 |
| 4.1. Prélèvementdes témoins | 26 |
| 4.2. Pochesdeconcentrés globulaires | 28 |
| 5. Analyse statistique | 29 |

Résultats

| | |
|--|-----------|
| 1. Etudedescriptivedespopulationsd'étude | 30 |
| 1.1. Répartitiondes témoins | 30 |
| 1.2. Répartitiondes poches | 30 |
| 1.3. Moyenne dutauxd'hémolyse destémoins | 31 |
| 1.4. Moyenne dutauxd'hémolyse despoches..... | 31 |
| 2. Etudeanalytique..... | 32 |
| 2.1.Comparaisondelamoyennedutauxd'hémolyseentreles différentessemaines | 32 |
| 2.1.1. Comparaisonentre la semaine S1etla semaine S2 | 32 |
| 2.1.2. Comparaisonentre la semaine S1etla semaine S3 | 32 |
| 2.2. ComparaisonselonlesCGRdépassantletauxnormald'hémolyse | 33 |
| 2.2.1. Comparaisonentre lasemaine S1etla semaine S2 | 33 |
| 2.2.2. Comparaisonentre la semaine S1etla semaine S3 | 33 |
| 2.3. Analyse des poches périmées | 34 |
| 3. Analyse des cas particuliers | 35 |
| Discussion | |
| 1. Testde lafragilitémembranaire parcytométrieenflux | 36 |
| 2. Comparaisondesmoyennesdutauxd'hémolyse obtenus | 38 |
| 3. Analyse despochespérimées..... | 38 |
| 4. Comparaison selon lesCGRdépassantletauxnormald'hémolyse..... | 38 |
| 5. Analyse descas particuliers | 40 |
| Conclusion | 41 |
| Annexes | |
| Références | |
| bibliographiquesRésumé | |

Liste des abréviations

7-AAD: 7-Amino Actinomycine D
AGLT : Acidified Glycerol Lysis
Test **AHAI** : Anémie Hémolytique Auto-Immune
ALAD : Amino Levulinic Acid Dehydratase
ARN : Acide Ribonucléique
CD: Classes de Différentiation
CDA: Dysérythropoïèses Congénitales de Type II
CGR: Concentré de Globules Rouges
CM: Carence Martiale
CMF: Cytométrie en Flux
CPD: Citrate Phosphate Dextrose
CPS : Concentré de Plaquettes
Standard **CSH** : Cellule Souche Hématopoïétique
CVO : Crise VasoOcclusive
EPO: Erythropoïétine
FSC: Forward Scatter Channel
GR: Globule Rouge **Hb** : Hémoglobine
LMD: List Mode Data
NK: Cellules Natural Killers
PAD : Pression Artérielle Diastolique
PAS : Pression Artérielle Systolique
PMT : Photomultiplicateurs
PSL: Produits Sanguins Labiles
SSC: Side Scatter Channel
TfR1: Récepteur à la transferrine de type I

Listed figures

| | |
|--|----|
| Figure1 :Présentationschématiqued'unglobulerouge..... | 3 |
| Figure2 :FrottisdesangnormalcoloréauMay-Grunwald-Giemsa(MGG)..... | 4 |
| Figure3 : Présentationschématiquedelastuctured'hémoglobine | 6 |
| Figure4 :Représentationschématiquedel'organisationdesprotéinesauseindela membraneérythrocytaire | 7 |
| Figure5 :Représentationschématiquedel'érythropoïèse | 11 |
| Figure6 :Représentationschématiqued'unexempledesystème deCMF | 18 |
| Figure7 : Lessystèmesd'uncytométrieenflux | 20 |
| Figure8 :Cytomèteen flux(AttuneNxt™)..... | 25 |
| Figure9 :Méthodesd'analysedeséchantillonsaucytomètre..... | 28 |
| Figure10 :Représentationgraphiquedelarépartitiondespoches | 31 |
| Figure11 :Représentationgraphiqueduchangementdutauxd'hémolyseenfonctiondutemps | 34 |

Listedestableaux

| | |
|---|----|
| Tableau1: Différentespréparationsdestubesdestémoins | 26 |
| Tableau2: Répartitiondespoches | 30 |
| Tableau3: Moyennesetécart-typesdespoches..... | 32 |
| Tableau4 : Comparaisondelamoyennedutauxd'hémolyseentrelessemainesS1/S2. | 32 |
| Tableau5: Comparaisondelamoyennedutauxd'hémolyseentrelessemainesS1/S3. | 33 |
| Tableau6 : Comparaisondutauxd'hémolyseentreS1/S2..... | 33 |
| Tableau7 : Comparaisondutauxd'hémolyseentreS1/S3..... | 33 |

Introduction

La transfusion sanguine est le transfert de sang ou de constituants du sang d'un individu (donneur) à un autre (transfusé) (**Bakary D., 2019**), elle est la procédure médicale la plus fréquemment réalisée dans le monde (**Roussel C. et al., 2020**). Il s'agit d'un acte régi par des règles strictes et des lois émanant de l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) et de l'Agence Nationale du Sang (ANS) pour l'Algérie.

Dans les pays à faibles revenus, la majorité (85 %) des transfusions de GR est administrée sous forme d'unités de sang total tandis que dans les pays à revenus élevés, les GR sont transfusés sous forme de concentrés érythrocytaires (CGR), provenant de la séparation du sang total en ses différents composants avant conservation et transfusion. Cette procédure permet de mieux répondre aux besoins spécifiques en éléments du sang et d'utiliser une unité de sang pour plusieurs patients (**Roussel C. et al., 2020**).

Les poches contenant le concentré de globules rouges (CGR) sont encadrées par des règles strictes de préparation, de conservation, de transport et d'utilisation dans le but de sécuriser le circuit transfusionnel. Les milieux de conservation utilisés ainsi que les conditions de stockage permettent de ralentir le vieillissement des érythrocytes au cours du stockage. Malgré cela, des lésions apparaissent progressivement au fur et au mesure du stockage, ce sont les lésions dites de stockage. Elles se traduisent notamment par des altérations métaboliques et morphologiques érythrocytaires (**Stein E., 2020**).

La mesure du taux d'hémolyse à la fin du stockage semble être le seul contrôle qualité représentatif des lésions de stockage. En effet, elle représente la fragilité des globules rouges à l'hémolyse soumise à un environnement hypotonique. Elle dépend de plusieurs facteurs, comme l'intégrité membranaire, le rapport surface/volume érythrocytaire mais aussi le métabolisme énergétique, facteurs qui sont altérés au cours du stockage.

La cytométrie en flux (CMF) est une technologie permettant l'analyse individuelle de cellules. Les cellules sont alignées selon le principe du centrage hydrodynamique avant de passer devant un faisceau laser. Les phénomènes optiques engendrés permettent une analyse des caractéristiques physiques (taille, structure) des cellules ou biologiques (**Zafrani L., Monneret G., 2017**). Elle est une technique nouvelle, rapide et s'est imposée comme la technique de choix pour l'étude de la fragilité de la membrane érythrocytaire par le test d'hémolyse.

Dans ce contexte s'inscrit l'objectif de notre travail qui vise à étudier la fragilité osmotique des concentrés de globules rouges (CGR) au cours du stockage, en utilisant le cytomètre Attune Nxt™ (Life Technologie) au sein du laboratoire d'hématologie de l'hôpital militaire régional de Constantine.

Le manuscrit est subdivisé en deux parties essentielles:

- La première partie présente une synthèse bibliographique ; dans laquelle nous apportons un premier chapitre consacré à la fragilité membranaire des érythrocytes et le don du sang. Un second chapitre porte sur les méthodes de détection de la fragilité de la membrane érythrocytaire.
- La deuxième partie expérimentale décrit le matériel utilisé et les manipulations réalisées, expose l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion.
- Notre travail sera finalisé par une conclusion qui mettra en avant l'essentiel de nos résultats avec des perspectives

Analysebibl iographique

Chapitre I : Fragilité membranaire des érythrocytes et don du sang

Partie I: Rappels sur les érythrocytes et la fragilité membranaire

I.1. Définition des érythrocytes

Découvert en 1658 par Swammerdam dans le sang de grenouille et par Loewenhoeck en 1673 dans le sang humain (Hermann H. et Cief J., 1976), les érythrocytes ou hématies ou encore globules rouges sont des objets biologiques de la taille d'un micron et l'un des principaux constituants du sang (François Y., 2021). L'érythrocyte est une cellule anucléée en forme de disque biconcave, cette forme particulière s'explique par l'absence de noyau, dont la membrane est percée de nombreux pores qui permettent les échanges avec l'extérieur. Son cytoplasme est composé d'hémoglobine, d'eau, de glucose, d'enzymes et d'ions principalement le potassium. Les érythrocytes transportent le dioxygène (via l'hémoglobine) des poumons aux tissus de l'organisme. Leur production est assurée par des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Matherat G., 2018).

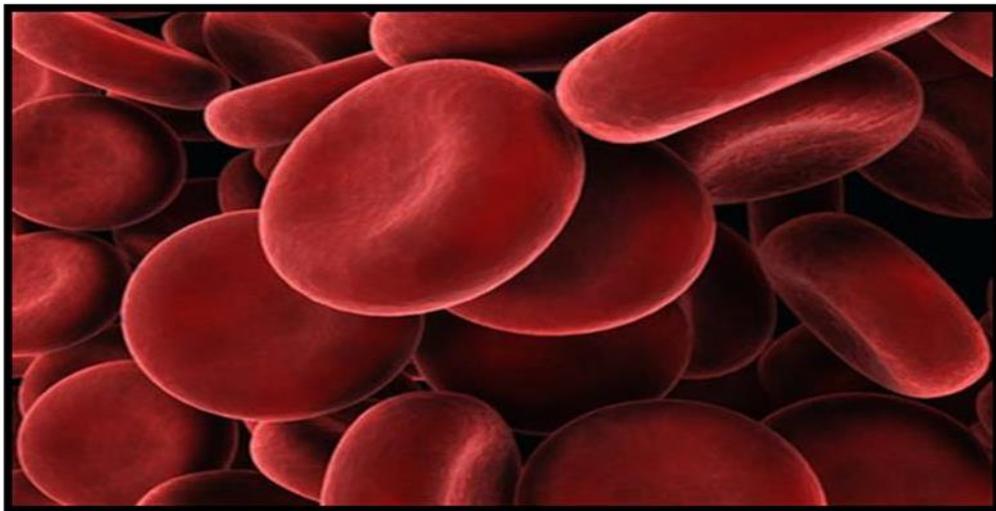


Figure 1: Présentation schématisée d'un globule rouge (Tahiri N., 2013).

I.2. Morphologie

La morphologie des globules rouges reste un aspect fondamental de l'évaluation hématologique. Les érythrocytes humains sont discoïdes (biconcaves), d'environ 7 à 8 μm (taille du noyau d'un petit lymphocyte) de diamètre, avec une zone centrale décolorée (qui occupe un tiers du diamètre des globules rouges) (Figure 2) et

l'hémoglobine qui occupe les deux tiers externes du diamètre des globules rouges (Samson A. *et al.*, 2019).

L'évaluation de la morphologie des globules rouges est une étape critique dans l'évaluation approfondie des frottis sanguins. Quatre caractéristiques de la morphologie des globules rouges doivent être évaluées : la couleur, la taille, la forme et les inclusions (Barger A., 2022).

L'observation des globules rouges, corrélée aux autres paramètres fournis par l'automate (volume globulaire moyen, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine, indice de distribution des globules rouges). Elle est particulièrement utile lors d'une anémie car certaines anomalies peuvent avoir une valeur diagnostique ou aider à la compréhension du mécanisme de cette anémie (Valensi F., 2005).

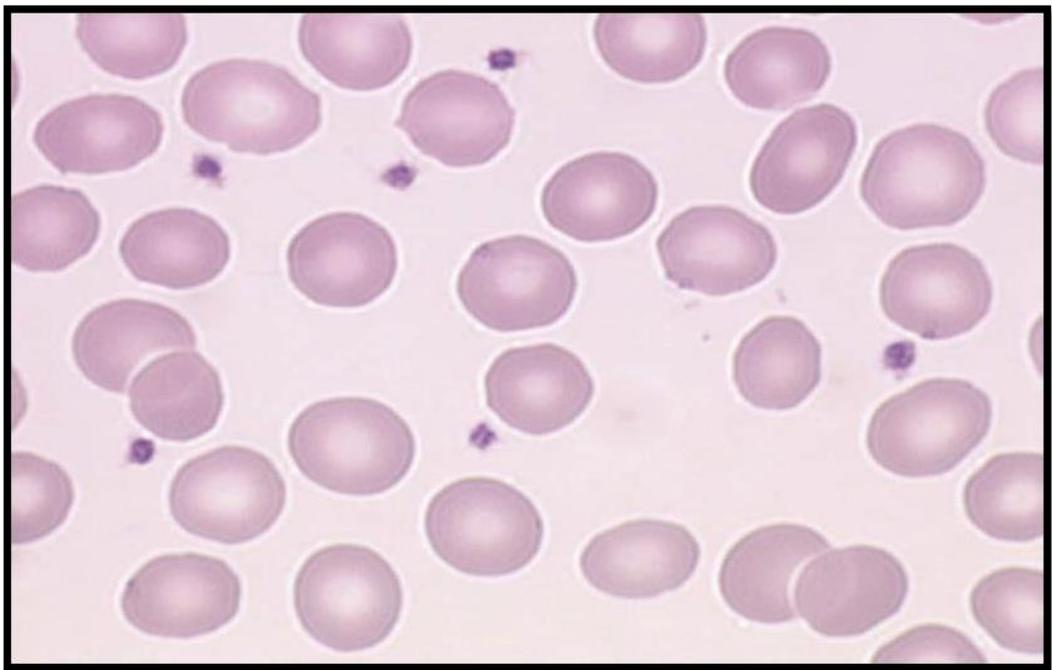


Figure 2 : Frottis de sang normal coloré au May-Grunwald-Giemsa (MGG) (Valensi F., 2005).

I.3. Déformabilité des globules rouges

La déformation des globules rouges est un des facteurs importants de leurs propriétés caractéristiques. En effet, dans le réseau capillaire cette déformation est fondamentale, le globule rouge doit emprunter des capillaires de diamètre bien inférieur au sien. Il doit être alors capable de se déformer en modifiant totalement sa forme afin

d'assurer les processus d'échange et de transport dans toute partie de l'organisme (Zatout S., 2002).

Les GRs doivent traverser les capillaires sanguins, qui peuvent présenter un diamètre contraignant pouvant atteindre 3 μm . Les GR parviennent à circuler par les capillaires grâce à leur grande capacité à se déformer qui résulte d'un amalgame de propriétés (kaushansky K. *et al.*, 2015).

La déformation des globules rouges s'effectue sans modification du volume ni de la surface, c'est-à-dire sans extension de la membrane. Cette déformation n'est cependant pas infinie. Elle est limitée par le rapport surface/volume. Il existe un diamètre minimum du tube dans lequel le globule rouge peut passer sans dommage, même si la membrane est parfaitement flexible ; pour le sang humain, ce diamètre limite est approximativement de 2,5 μm (Wong X., 1990).

I.4. Constituants des globules rouges

A l'état normal selon (Smaili F., 2003); tous les globules rouges ont la même forme, taille et coloration. Le globule rouge comprend deux parties : une membrane et un contenu représenté par : 63% d'eau, 33% d'hémoglobine, 4% d'enzymes et d'électrolytes

I.4.1. Hémoglobine

L'hémoglobine (Hb) est le constituant majeur des érythrocytes. Un érythrocyte normal contient 640 millions de molécules d'Hb qui confèrent au sang sa couleur rouge (Steiger A., 2015). La fonction essentielle du globule rouge est le transport de l'oxygène des poumons aux tissus, qui se fait grâce à l'Hb. Cette dernière est l'une des protéines les mieux connues, stables et faciles à obtenir.

L'Hb est une protéine tétramérique de 64000 Daltons constituée de quatre sous-unités identiques deux à deux, associées par des liaisons non-covalentes, sa synthèse se situe dans le cytoplasme des érythroblastes médullaires. Chaque sous-unité est composée d'une partie protéique, la globine, alpha ou non-alpha (l'hémoglobine adulte HbA: $\alpha_2\beta_2$). Chaque chaîne de globine renferme un site actif de liaison avec l'oxygène : l'hème, dans une poche hydrophobe (Figure 3). La poche d'hème permet la fixation d'oxygène en protégeant l'atome de fer contre l'oxydation (Lokwani D., 2013).

L'hème est composé d'une Protoporphyrine IX et d'un atome de fer à l'état ferreux (Fe^{2+}) en position centrale. Le fer présente 6 liaisons de coordination : 4 interviennent dans la structure de l'hème, une avec la globine et une avec l'oxygène. Donc, chaque molécule d'hémoglobine peut fixer quatre molécules d'oxygène pour former l'oxyhémoglobine, une par atome de fer.

L'autre fonction est le transport du gaz carbonique des tissus aux poumons, seulement une partie de CO_2 est transporté. L'Hb fixe le gaz carbonique non pas sur le fer comme l'oxygène, mais sur des groupements aminés latéraux de la globine pour constituer la carbohémoglobine (Vanbergen O. *et al.*, 2018).



Figure 3: Présentation schématique de la structure d'hémoglobine web.

I.4.2. Membrane érythrocytaire

C'est une enveloppe souple ayant un rôle essentiel dans le maintien de la forme et la déformabilité ; c'est à son niveau qu'agissent la plupart des facteurs physiques ou chimiques, qui peuvent induire des perturbations morphologiques et/ou fonctionnelles du globule rouge (Smaili F., 2003).

La membrane érythrocytaire renferme 52% de protéines, 40% de lipides et 8% de glucides. Elle est constituée d'une bicouche phospholipidique et des protéines, périphériques ou insérées dans la bicouche lipidique. Les protéines sont situées à la face

interne de la bicouche lipidique constituent le squelette du globule rouge. Ce squelette est responsable de la forme et la flexibilité des globules rouges normaux (de Oliveira S. et Saldanha C., 2010).

La membrane érythrocytaire englobe des protéines extra-membranaires, des protéines dites périphériques et des protéines transmembranaires (ou intégrées). Les protéines extra-membranaires sont des protéines structurales qui tapissent la face cytoplasmique de la membrane et constituent le cytosquelette : spectrine (protéine majeure), actine, ankyrine et protéine 4.1. (Figure 4). Tandis que les protéines transmembranaires pénètrent dans la bicouche lipidique. Il s'agit notamment de la protéine bande 3 et des glycophorines. La protéine bande 3 est le composant principal de cette catégorie, c'est un canal échangeur des anions. Elle joue un rôle essentiel dans les échanges O_2/CO_2 au niveau des GR et elle présente un domaine cytoplasmique qui sert de point d'ancrage du squelette cytoplasmique (de Oliveira S. et Saldanha C., 2010).

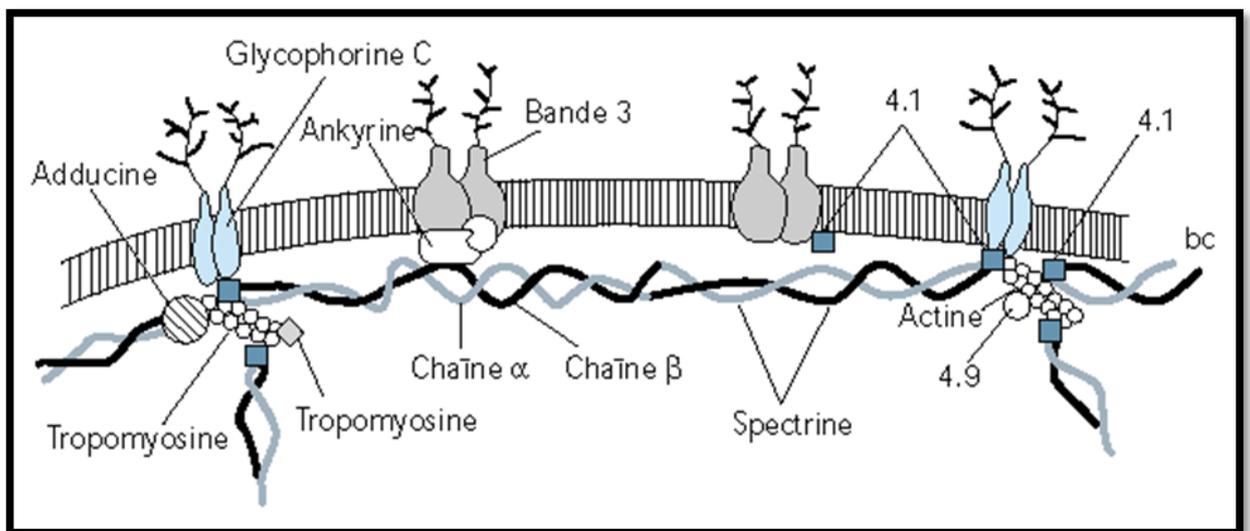


Figure 4:

Représentation schématisée de l'organisation des protéines dans la membrane érythrocytaire (Cisse H., 2018).

I.4.3. Fragilité membranaire des érythrocytes

La fragilité osmotique des globules rouges décrit la capacité des cellules à incorporer une solution hypotonique ; selon le rapport surface / volume l'hémolyse diffère d'une cellule à une autre (Ciepiela O. et al., 2018).

Il existe deux techniques utilisées pour mesurer la fragilité membranaire :

- Technique de routine : Correspond à introduire une suspension d'hématies dans une solution hypotonique ; puis mesurer la résistance de la membrane par un fragilimètre (Didelon J., 2001).
- Technique couplée au CMF (Cytométrie En Flux) : Tend vers le comptage des cellules restées intactes et également celles lysées en temps réel ; après leur mise en suspension dans une solution hypotonique.

D'une autre manière on utilise un milieu hypotonique contenant du glycérol qui ralentit l'entrée d'eau dans le globule rouge. On mesure le temps nécessaire pour obtenir 50 % de l'hémolyse initiale (AGLT 50 : Acidified Glycerol Lysis Test) c'est-à-dire la valeur de l'absorbance mesurée à 625 nm avant l'addition du glycérol (Ciepiela O. et al., 2018).

Le test de la fragilité érythrocytaire est applicable dans les cas suivants :

a. Augmentation de la fragilité

✓ Anémies hémolytiques auto-immunes

L'anémie hémolytique auto-immune (AHAI) est une cytopénie auto-immune qui se caractérise par la diminution de la durée de vie des globules rouges du fait d'auto-anticorps (AC) dirigés contre les protéines membranaires érythrocytaires qui conduisent à une hémolyse intravasculaire ou intratissulaire (Ciudad M., 2022).

✓ Maladie hémolytique du nouveau-né

La maladie hémolytique du nouveau-né se développe lorsque des anticorps IgG de la mère spécifiques des antigènes sanguins du fœtus traversent le placenta et détruisent les globules rouges fœtaux. Les conséquences d'un tel passage peuvent être mineures, modérées, sévères, ou létales. La forme sévère de la maladie, appelée érythroblastose fœtale, a lieu le plus fréquemment lorsque la mère et le fœtus expriment des allèles différents de l'antigène Rhésus (Rh) (Judith A. et al., 2013).

✓ Anémies hémolytiques dues à une intoxication chimique (plomb)

L'anémie est une manifestation clinique typique des globules rouges due à la toxicité du plomb. Les jeunes enfants carencés en fer sont plus susceptibles de développer une anémie clinique induite par le plomb. Une forte exposition au plomb chez l'homme peut entraîner une anémie hémolytique. Plus de 99 % du plomb est distribué dans les globules rouges plutôt que dans le plasma, il provoque l'anémie en

bloquant l'activité de la ferrochélatase, de l'aminolévulinate synthase et de l'ALAD (Aminolévulinic acid déshydratase) (Kim H. *et al.*, 2015).

✓ Sphérocytose héréditaire

Elle est la plus fréquente des anémies hémolytiques constitutionnelles en rapport avec une anomalie de la membrane des GR. Elle est secondaire à une perte de la stabilité de la membrane érythrocytaire, par défaut des interactions « verticales » entre la double couche lipidique et le squelette protéique sous-membranaire. Cette anomalie est due à une diminution d'une des protéines de la membrane érythrocytaire entraînant une perte de stabilité. Cette maladie est à l'origine d'une réduction de la surface membranaire par micro vésiculation, une diminution du ratio surface/volume du GR et de la déformabilité érythrocytaire. En conséquence, les sphérocytes ne pourront plus se déformer suffisamment pour passer au travers des cellules endothéliales entre les cordons spléniques et les sinus, d'où l'allongement du temps de rétention dans les cordons et l'hémolyse intra splénique quasi pure (Chiche E. et Caulier A., 2018).

b. Diminution de la fragilité

✓ Thalassémie

Les β -thalassémies sont des maladies génétiques parmi les plus fréquentes ; elles sont dues à un déficit plus ou moins complet de la synthèse de la chaîne β d'hémoglobine. La forme la plus sévère est l'anémie de Cooley (bêta thalassémie homozygote majeure). Les sujets sont profondément anémiques ($Hb \leq 7$ g/dl), cette anémie est potentialisée par l'excès relatif de la chaîne α -globine qui précipite, entraînant des lésions membranaires, une destruction des érythroblastes, une formation d'hémichromes et une production de radicaux oxydatifs libres (ROS) (Vaulont S. et Labie D., 2011).

✓ Anémie drépanocytaire

La drépanocytose est une maladie héréditaire de l'hémoglobine. Selon l'OMS, près de 5% de la population mondiale, sont porteurs d'un gène responsable d'une anomalie de l'hémoglobine. (Thiam *et al.*, 2017). L'hémoglobine S anormale qui la caractérise, sous certaines conditions notamment en cas de baisse de la pression partielle du sang en oxygène, polymérise et forme de longues fibres rigides responsables d'une déformation du globule rouge en faucille (falciformation). La falciformation des globules rouges et la réduction de leur déformabilité induisent une obstruction au niveau

de la microcirculation capillaire et des infarctus d'organes responsables de crises douloureuses dont la manifestation la plus fréquente est la crise vasoocclusive (CVO) simple (Diallo L. *et al.*, 2022).

I.5. Erythropoïèse

I.5.1. Définition

L'érythropoïèse est le processus par lequel l'organisme assure la production des GR à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) pluripotente. Chaque jour 200 milliards de GR sont produits par la moelle osseuse de l'adulte sain. C'est une compensation des pertes physiologiques avec élimination des GR vieillissants et le maintien de l'hémoglobine sanguine à une valeur stable tout au long de la vie adulte pour garder une masse globulaire physiologique constante.

Ce phénomène physiologique englobe un ensemble de processus biologiques et métaboliques d'engagement, de différenciation, de prolifération et de maturation cellulaires. C'est un phénomène permanent (sans cesse), adaptatif (production 7 à 10 fois normale), obéissant à une régulation importante, à différents niveaux.

Selon (Sultan C. *et al.* 1996), l'érythropoïèse normale comprend :

- Une réduction de la taille de l'érythroblaste.
- Une diminution du rapport nucléocytoplasmique.
- Une synthèse progressive de l'hémoglobine.
- Une expulsion du noyau.
- Une mort intramédullaire de 5 à 10 % des érythroblastes : il s'agit de l'érythropoïèse inefficace physiologique.

I.5.2. Etapes de l'érythropoïèse

A l'état basal, nous avons environ 250 milliards d'érythroblastes dans la moelle et 25000 milliards de globules rouges dans le sang. L'érythropoïèse permet la production de deux millions de globules rouges par seconde chez l'homme, c'est donc l'un des systèmes de prolifération les plus importants de l'organisme. Ce processus nécessite une régulation fine afin de maintenir une production de globules rouges adaptée en permanence aux besoins.

Plusieurs facteurs sont absolument nécessaires à l'érythropoïèse, parmi lesquels l'érythropoïétine (EPO) et le stem cell factor (SCF). Les récepteurs à l'EPO (EPO-R) et au SCF (c-Kit) sont donc fortement exprimés au cours de l'érythropoïèse, en fonction du stade de maturation. Les érythroblastes expriment également fortement le récepteur à la transferrine de type 1 (TfR1), afin de capter le fer nécessaire à la synthèse de l'hémoglobine. La transferrine est la protéine de transport du fer, capable de se fixer au TfR1 pour induire l'entrée du fer dans la cellule. La transferrine chargée en fer est appelée holo-transferrine ou holoTf (Figure) (Oltova J. *et al.*, 2020).

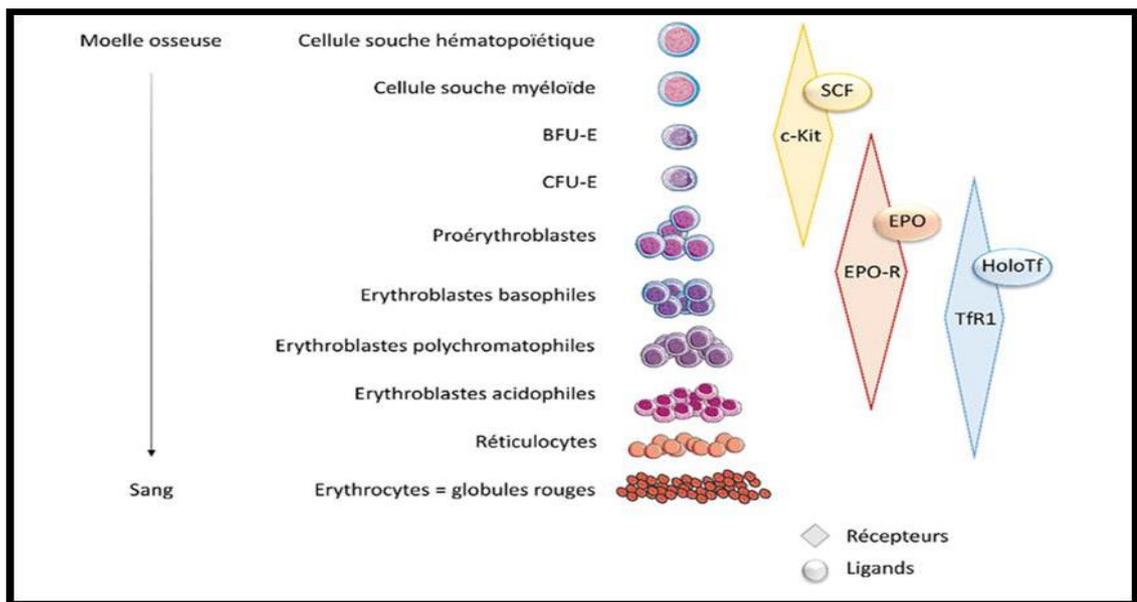


Figure 5: Représentation schématisée de l'érythropoïèse (Fouquet G., 2019).

I.6. Vieillesse des globules rouges et hémolyse

Le globule rouge normal vit en moyenne 120 jours et meurt par vieillissement, c'est l'hémolyse physiologique (Levy J., 2004).

Le vieillissement se traduit par :

- Une diminution des activités enzymatiques.
- Une augmentation de la résistance en milieu acide.
- Une diminution de la charge électrique (Sultan C. *et al.*, 1996).

Chez le sujet normal, la majorité des GR sont détruits par phagocytose dans les macrophages de la moelle osseuse.

La lyse des GR entraîne une libération des molécules d'Hb qui sont captées par l'haptoglobine synthétisée par le foie. Le complexe hémoglobine-haptoglobine est capté

par l'hépatocyte au niveau duquel l'Hb est dégradée. Si la capacité de fixation de l'haptoglobine est débordée, l'Hb en excès reste libre et traverse le filtre glomérulaire après dissociation de la molécule d'Hb en deux dimères α et β qui sont réabsorbés par les cellules du tubule rénal. Une hémoglobinurie apparaît quelques jours plus tard. Une autre voie d'élimination de l'Hb libérée dans la circulation qui consiste à son auto-oxydation en méthémoglobine et sa dissociation en globine et hème. L'hème peut être fixé soit à l'hémopexine soit à l'albumine pour rejoindre l'hépatocyte (Elleuch H., 2004b).

Partie II: Rappels sur le don du sang

II.1. Don du sang

Le don du sang est un acte volontaire, anonyme et exclusif de tout commerce (**Rampal P., 2000**).

Un donneur doit être un adulte (plus de 18 ans) avec un poids supérieur à 50 kg; auscultation (50-110 battements/min); pression artérielle systolique (PAS) (100-180 mmHg) ; pression artérielle diastolique (PAD) (60-80 mmHg) ; il doit être en bonne santé au moment du don ; exclu de toute pathologie (particulièrement celles transmises par le sang); sans antécédents médicaux ni de transfusion et répondre par des informations appropriées à un questionnaire posé pour l'évaluation de sa santé (**Tissot J. et al., 2013**).

II.2. Types de don

Le don du sang est à ce jour la seule source possible de produits sanguins cellulaires : concentrés de globules rouges, plaquettes, granulocytes et de plasma frais ou congelé. Le plasma humain demeure également une source majeure de production de concentrés de protéines utilisables en thérapeutique (albumine, immunoglobulines, protéines de la coagulation).

Comme toutes les activités transfusionnelles, le don du sang est encadré par des textes réglementaires appelés bonnes pratiques transfusionnelles. On distingue deux types de don :

- Le don de sang total : qui correspond au prélèvement aseptique de 400 à 500 ml de sang veineux, et qui permet la préparation d'un concentré de globules rouges (CGR), d'une unité de plasma destiné au fractionnement, et éventuellement d'un concentré de plaquettes standard (CPS) (**Cabaud J., 2016**).
- Les dons d'aphérèse : qui permettent le prélèvement direct de produits sanguins (globules rouges, plaquettes, granulocytes, plasma). L'utilisation de séparateurs cellulaires automatisés permet de prélever un (aphérèse simple) ou deux produits différents (aphérèse combinée) (**Danic B., 2005**).

II.3. Préparation des produits sanguins labiles

Après recueil du sang total dans une poche "1" contenant le CPD ; le sang total est ensuite transféré vers une poche "2" en passant par un filtre déleucocytaire, ensuite le sang est centrifugé; le plasma qui est en haut est transféré vers une poche "3" par

une presse ; une autre poche contenant du SAG Mannitol est versée dans la deuxième poche qui contient le concentré globulaire.

Les PSL préparés sont le CGR, le CPS et le plasma.

Les poches subissent un contrôle de conformité qui comporte un phénotypage ABO/Rhet un test sérologique. Si les résultats sont conformes ; les poches seront étiquetées. Sinon, elles vont être détruites (**Beauplet A. et al., 2013**).

II.4. Conservation des poches

Quatre-vingt-dix millions de patients reçoivent une transfusion de globules rouges chaque année. Cette procédure nécessite une étape de stockage des globules rouges entre le don et la transfusion au receveur, permettant la réalisation de contrôles de qualité et une meilleure gestion des flux. Les nombreuses améliorations techniques des dernières décennies permettent aujourd'hui le stockage réfrigéré des concentrés érythrocytaires (CGR) pendant 42 jours avant utilisation. Ce stockage s'accompagne cependant d'altérations des globules rouges, collectivement nommés les « lésions » de stockage, dont l'amplitude augmente avec la durée de conservation et serait responsable de la clairance post-transfusionnelle précoce d'une partie des globules rouges transfusés (en moyenne 18 %), diminuant d'autant le rendement transfusionnel. L'impact de la durée de conservation sur la sécurité transfusionnelle a été largement débattu au cours des dernières années et, si l'innocuité de la prise en charge standard semble établie, la question de la sécurité des CGR après 35 jours de stockage est l'objet de controverses.

En Europe, le seul critère de qualité des CGR est l'hémolyse à 42 jours qui ne doit pas dépasser 0,8%, mais ce paramètre n'a pas été corrélé au rendement transfusionnel. De nouveaux marqueurs, notamment basés sur les modifications morphologiques liées au stockage, pourraient être mieux corrélés au rendement transfusionnel (**Roussel C. et al., 2020**).

ChapitreII:Méthodesdedétectiondelafragilitédelamembraneérythrocytaire

La fragilité osmotique du globule rouge est augmentée en raison d'une diminution de la surface membranaire par rapport à son volume. Elle est évaluable par plusieurs tests. Tous ces tests d'hémolyse peuvent être positifs dans d'autres anomalies membranaires: les anémies hémolytiques auto-immunes, les formes sévères d'elliptocytose héréditaire (pyropoïkilocytose héréditaire), dans certaines dysérythropoïèses congénitales de type II (CDA II) mais cela uniquement pour les tests dépendant du rapport surface/volume (Olivia H., 2020).

1. Pink test

Le Pink test est un test de lyse au glycérol acidifié modifié. Il mesure l'hémolyse via l'absorbance d'un échantillon sanguin de faible volume (1 tube EDTA de 5 mL) incubé dans une solution contenant du glycérol, de NaCl, du NaN₃ et du HCl. Il s'agit d'incuber les globules rouges du témoin et les globules rouges du patient en présence de la solution avant de réaliser une centrifugation. La densité optique du surnageant est mesurée à 540 nm (première absorbance).

Une deuxième mesure de l'absorbance est réalisée lorsque tous les globules rouges ont été lysés grâce au triton. Un rapport entre les deux valeurs d'absorbance est ensuite réalisé. Chez le sujet sain, ce rapport est inférieur à 20%.

Ce test est caractérisé d'une grande reproductibilité et haute sensibilité (Olivia H., 2020).

2. Test de résistance globulaire

Ce test est appelé test de Dacie, il est découvert par Chauffard et repose sur la diminution du rapport surface/volume. Lorsque ce rapport est diminué, le volume critique d'hémolyse est atteint plus rapidement avec des solutions d'osmolarité plus élevée: la résistance aux solutions hypotoniques est diminuée (Rouvière J., 2008).

Lorsque des hématies sont plongées dans une solution hypotonique au plasma, elles subissent une hémolyse au cours de laquelle l'hémoglobine passe du globule dans la solution qui se laque. L'utilisation des solutions salines à une concentration de 7 à 9 g par litre d'eau pour garder les hématies intactes.

Cette hémolyse s'explique surtout par des phénomènes d'osmose. Les globules, limités par une membrane semi-perméable, se gonflent dans les solutions hypotoniques

ou l'eau distillée, puis éclatent. Ils se rétrécissent au contraire dans les solutions hypertoniques.

En pratique, lorsque l'on place des hématies dans des solutions de concentrations différentes, préparées à partir d'une solution de chlorure de sodium à 1 p. 100 (solution la plus employée) la turgescence et l'hémolyse se produisant aux concentrations inférieures sont une indication de la résistance des hématies aux solutions hypotoniques.

Ce comportement des globules rouges en présence de solutions salines de concentration différentes est le suivant:

- Lorsque les hématies sont dans une solution isotonique (9 g de NaCl pour 1 000) la membrane érythrocytaire constitue une barrière entre les deux milieux. Rien ne passe à travers cette membrane. Il y a un état d'équilibre osmotique.
- Les hématies en présence d'une solution hypertonique (> à 9 g de NaCl pour 1000) se vident d'eau et leur volume diminue. Les globules rouges prennent un aspect crénelé.
- Enfin, les hématies en présence d'une solution hypotonique (< à 9 g de NaCl pour 1 000) se gonflent d'eau jusqu'à ce que la concentration des électrolytes soit égale à l'intérieur comme à l'extérieur. Dans ce cas, on distingue 3 stades successifs.
- L'eau entre dans les globules rouges à travers la membrane. Le disque biconcave figuré par l'hématie normale devient une sphère par gonflement.
- L'eau continue à pénétrer. Il y a distension de la membrane et augmentation du volume de la « sphère » jusqu'au « volume critique » avant l'éclatement.
- L'eau pénètre encore et il y a éclatement de la membrane érythrocytaire avec fuite d'hémoglobine à l'extérieur. C'est l'hémolyse, le « volume critique » ayant été dépassé (Quéval R. *et al.*, 1989).

Cette technique est laborieuse et lourde à mettre en œuvre (Rouvière J., 2008), aussi elle est caractérisée d'une faible sensibilité (70 %) et d'une spécificité (71 %) (Olivia H., 2020).

3. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui consiste à faire passer les cellules d'un échantillon une par une devant un faisceau laser. Ces cellules sont au préalable marquées par des anticorps couplés eux-mêmes à des fluorochromes.

Lors de la rencontre du faisceau laser avec une cellule marquée, deux types de signaux lumineux sont émis :

- Un signal diffracté et dispersé par la cellule en fonction de sa taille et de ses constituants.
- Un signal émis par les fluorochromes.

Ces fluorochromes ont des longueurs d'onde d'absorption et d'émission spécifiques à chacun d'entre eux. Il s'agit du principe de Stokes, le fluorochrome absorbe l'énergie lumineuse et passe à un état excité (spectre d'absorption) puis restitue l'énergie sous forme de lumière en se désexcitant (spectre d'émission). Le spectre d'émission de chaque fluorochrome a une longueur d'onde qui lui est propre (Mohabeer K., 2018).

3.1. Principe de la CMF

La CMF consiste à mesurer ou calculer les propriétés de particules en suspension dans un liquide de gaine lors de leur passage (une à une en théorie) dans une fenêtre de détection (Alaterre E., 2020).

Il est composé d'une source lumineuse de type laser, une photodiode dans l'axe du laser permettant de mesurer le paramètre FSC et des photomultiplicateurs permettant de mesurer le paramètre SSC et les différentes fluorescences (Figure).

En hématologie, ces particules sont des cellules issues d'un échantillon biologique tel que le sang ou la moelle osseuse. Les cellules sont suspendues dans un liquide et passent les unes à la suite des autres (en théorie) dans une fenêtre de détection.

Chaque événement passe devant le faisceau lumineux d'une ou plusieurs sources lumineuses (laser, diode) et va diffracter de la lumière dans l'axe et à 90°, c'est ce que l'on appelle respectivement les signaux du « Forward Scatter Channel » (FSC) et du « Side Scatter Channel » (SSC). Simultanément, la fluorescence de fluorochromes ou de molécules ayant des propriétés fluorescentes présentes à la surface ou à l'intérieur de la cellule peut être mesurée. Les mesures FSC et SSC permettent de déterminer les caractéristiques physiques et biologiques cellulaires. Le FSC correspond à l'intensité de la lumière diffractée de la source d'excitation dans l'axe (angle <math>< 12^\circ</math>) et est proportionnelle à la taille de la cellule, alors que le SSC correspond à l'intensité de la

lumière diffractée orthogonalement (angle proche de 90°) par rapport à la source lumineuse, elle est représentative de la complexité intracellulaire.

Des AC couplés à des fluorochromes, vont reconnaître spécifiquement des Aggréments à la surface de la cellule ou des protéines intracytoplasmiques. L'excitation des fluorochromes couplés aux AC par la source lumineuse va permettre de discriminer les populations d'intérêt. De plus, certaines molécules comme le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) ou le 7AAD (7-Aminoactinomycine D) s'intercalant à l'ADN possèdent des propriétés de fluorescence et sont reconnues de la même façon que les couples AC/fluorochromes.

L'ensemble des données sont récupérées grâce au logiciel d'acquisition du cytomètre et seront ensuite traitées sous forme de histogrammes ou de graphiques multidimensionnels (souvent deux dimensions) grâce à des logiciels (Alaterre E., 2020).

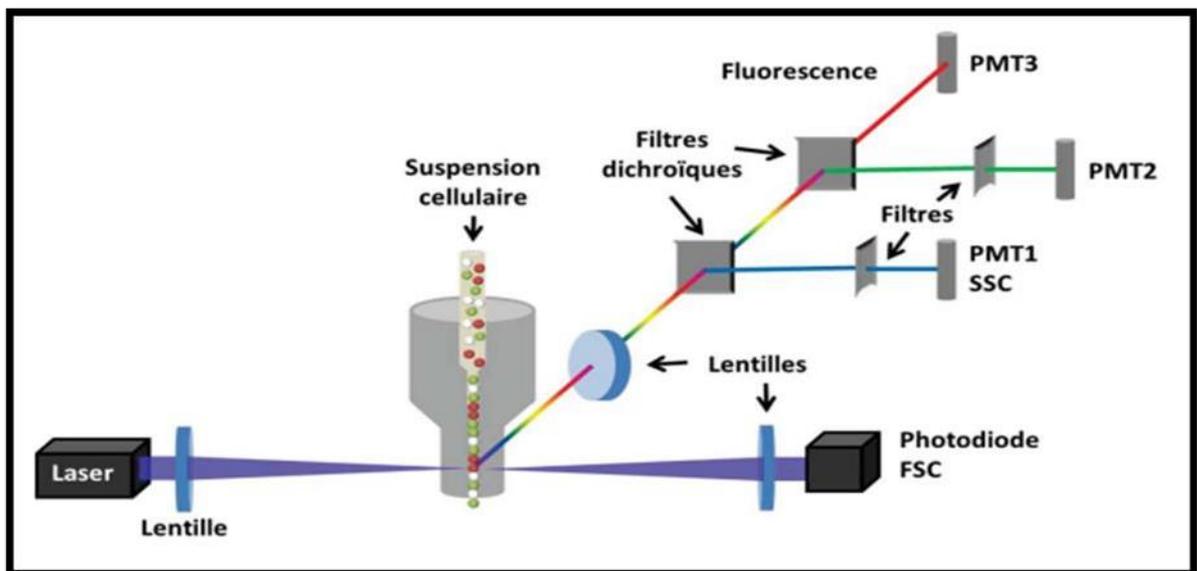


Figure 6 : Représentation schématique d'un exemple de système de CMF (Alaterre E., 2020).

3.2. Systèmes de la CMF

3.2.1. Système fluide

Un système fluide pour introduire, canaliser les cellules et les amener au niveau du laser. Les cellules en suspension sont introduites dans une veine liquide sous pression (liquide de gaine) qui aura pour effet d'aligner et espacer les cellules en vue de l'analyse (Zafrani L. et Monneret G., 2017).

3.2.2. Système optique

Un système optique qui se compose de lasers et de filtres pour exciter, détecter et amplifier les différents signaux émis (miroirs dichroïques, photomultiplicateurs) (Zafrani L. et Monneret G., 2017).

3.2.3. Système électronique

Permet de convertir les signaux optiques (photons) en des signaux électroniques (volts) (Zafrani L. et Monneret G., 2017). Ces signaux sont amplifiés puis convertis sous forme numérique pour être analysés par le système informatique. Ceci est réalisé par des photodétecteurs. Il en existe plusieurs types dont principalement les photodiodes et les photomultiplicateurs (PMT). Les photodiodes moins sensibles que les

PMT sont généralement utilisés pour la détection de la lumière diffractée et les photomultiplicateurs (PMT) pour les rayons fluorescents. Cependant ces derniers peuvent également être utilisés pour les paramètres de diffraction. Chaque signal lumineux est capté par son propre photodétecteur (Fritz S., 2017).

3.2.4. Système informatique

Il convertit les données statistiques obtenues à partir des données brutes nommées « fichiers en mode liste » en histogrammes et/ou cytogrammes interprétables (Figure 8). Le fichier de référence internationale est le FCS (Flow Cytometry Standard), il contient des données brutes de chaque événement, ainsi que les paramètres utilisés tels que réglages et compensations. Le LMD (List Mode Data) contient aussi des masques d'analyses (histogramme et cytogramme) faits sur le logiciel d'acquisition (Fritz S., 2017).

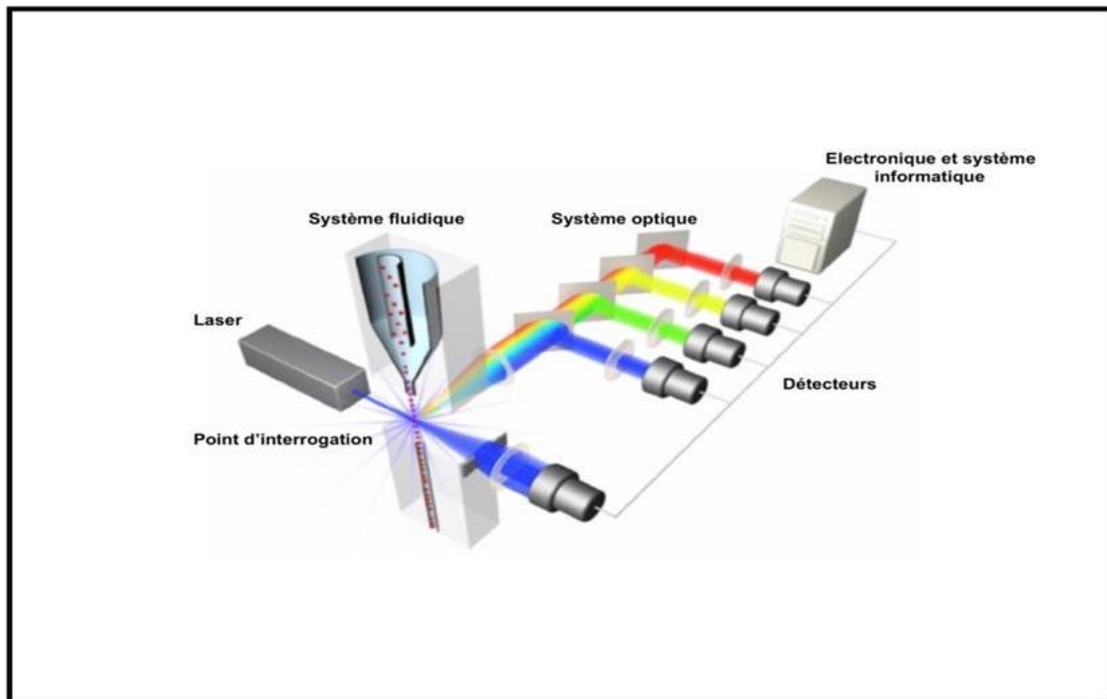


Figure7 : Lessystèmesd'uncytométrieen flux (AutissierP.,2010).

4. Applicationsdela CMF

4.1. Immunophénotypage

Une des applications cliniques les plus courantes delà cytométrie en flux est ladétermination des antigènes cellulaires. Il s'agit de l'immunophénotypage des cellulesnormalesetpathologiques.L'utilisation desanticorpsmonoclonaux spécifiquesdesclasses de différenciation (CD) des leucocytes humains va permettre la reconnaissance d'un certain nombre de populations cellulaires. A ce jour ; plus que 200 CD ont étédéfinies. Certaines sont restreintes à des lignées, d'autres correspondent à des stades dedifférenciationouàdes aspects fonctionnels.

Ondisposed'anticorpsquireconnaissent:

- Designéescellulaires:lymphocytesT,lymphocytesB,cellulesNaturalKillers (NK), cellules myéloïdes, monocytes et macrophages, depuis la cellule souchejusqu'àlacellulemature.
- Desmarqueursd'adhésionoud'activationdesrécepteursdecytokines.
- Des populations fonctionnellement définies : cellules cytotoxiques, sécrétrices,auxiliaires,suppressives,mémoires...(ElleuchH.,2004a).

Une autre application de la CMF est le phénotypage des leucémies, il s'agit d'une méthode délicate effectuée à partir d'un prélèvement de moelle osseuse ou à partir d'un prélèvement sanguin. Certaines leucémies peuvent être attribuées à des lignées de type T ou à des lignées de type B, d'autres appartiennent à des lignées myéloblastiques ou monocytaires. Dans un certain nombre de cas, des leucémies multiphénotypiques peuvent apparaître et présenter des marqueurs appartenant à plusieurs lignées, phénotypes que l'on ne retrouve habituellement pas sur des cellules normales. Dans d'autres cas, une absence totale de marqueurs de lignées cellulaires peut faire conclure à une leucémie de type indéterminée.

4.2. Numération des cellules souches circulantes

La numération des cellules CD34⁺ se fait par cytométrie en flux. Cette technique a l'avantage d'être rapide et standardisée selon les recommandations de l'ISHAGE (International Society of Hemotherapy and Graft Engineering).

Trois marqueurs sont utilisés : (1) le CD34, marqueur de population riche en cellules progénitrices, (2) le CD45, marqueur de tous les leucocytes, (3) et le 7-AAD (7-Amino Actinomycine D), agent intercalant de l'ADN marqueur de la viabilité cellulaire.

Des billes calibrées fluorescentes sont ajoutées à l'échantillon permettant d'obtenir directement le nombre de cellules CD34⁺ en valeur absolue. La population d'intérêt exprime le CD34, faiblement le CD45 et présente des caractéristiques de taille et de structure proche de celles des lymphocytes. Les cellules non viables sont marquées par le 7-AAD et sont soustraites de cette population.

Le résultat est rendu en nombre de cellules CD34⁺ viables/ μ L pour les prélèvements sanguins en pré-aphérèse. Pour les prélèvements des produits d'aphérèse, le résultat est normalisé par le poids du patient (Schuppe L., 2018).

4.3. Cycle cellulaire et la CMF

La CMF permet d'étudier les différentes phases du cycle cellulaire dans les tumeurs pour juger de leur potentiel de prolifération et détecter la présence éventuelle de clones cellulaires à contenu anormal en matériel génétique.

4.4. Numération des réticulocytes

Les réticulocytes sont des globules rouges qui ont été mis en circulation depuis moins d'un à deux jours. Leur numération est un des tests les plus utiles pour le

diagnostic de l'anémie. Le pourcentage normal de réticulocytes est seulement de 0,5 à 1,5 % et ainsi, pour une précision satisfaisante, il faut compter au moins 1000 cellules. Ce qui prend beaucoup de temps, s'il est fait manuellement. L'numération des réticulocytes peut se faire par CMF utilisant le plus souvent le thiazole orange (émission à 530 nm), mais également l'acridine orange comme marqueur de l'ARN.

4.5. Tricellulaire

Le tri cellulaire est la possibilité de séparer physiquement différentes sous-populations cellulaires. Les cellules sont triées selon les propriétés observées lors de l'analyse. Les particules qui présentent un intérêt sont chargées électriquement, déviées à la sortie par un champ électrique et collectées dans deux tubes (les positives d'un côté et les négatives de l'autre). Les particules non chargées sont éliminées.

Le tri permet d'obtenir une population homogène de cellules dans un état de pureté qui permet leur remise en culture et maintient leurs principales caractéristiques (**Elleuch H., 2004a**).

5. Intérêt de la CMF

La CMF a plusieurs avantages:

- Détection et quantification de nombreuses sous-populations cellulaires simultanément.
- Comptage de centaines de fois plus vite que pour les techniques manuelles de immunofluorescence.
- Reproductibilité des résultats et bonne sensibilité.
- Quantification précise de l'intensité du signal permettant le tri cellulaire (**Elleuch H., 2004a**).

6. Inconvénients de la CMF

Les fluorochromes utilisés en cytométrie conventionnelle ont des spectres d'émission souvent larges avec des recouvrements qui peuvent être importants. Le choix des fluorochromes pour effectuer un phénotypage multiple sur une même cellule est donc crucial et détermine la stratégie d'analyse. Le spectre d'émission de fluorescence étant segmenté, avec des miroirs dichroïques et des filtres passe-bande, la lumière recueillie par le détecteur ne représente en fait qu'une fraction de la lumière émise (**Thierry I. et al., 2018**).

Matériel et méthodes

1. Type et lieu d'étude

Dans le cadre de l'objectif de notre travail, une étude transversale a été réalisée au laboratoire d'hémodiagnostic de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine (HMRUC) sur une durée de 3 mois de la période allant du mois de Mars au mois de Juin de l'année en cours.

2. Echantillons

Notre étude porte sur des concentrés de globules rouges préparés à partir de sang des témoins et des poches de donneur de sang. Le choix des tubes des patients et des poches se fait selon les critères suivants :

2.1. Prélèvement des témoins

Il s'agit du sang total prélevé sur des tubes EDTA de 20 patients disponibles au niveau du laboratoire d'hémodiagnostic de l'hôpital.

✚ **Critères d'inclusion** : sont inclus dans notre étude :

- Les patients présentant une FNS sans anomalie.
- Les patients sans antécédents d'anémie.

✚ **Critères d'exclusion** :

- Les patients présentant une anémie ou autre anomalie des globules rouges.

2.2. Poches de concentré globulaire

Il s'agit de concentrés de globules rouges de 72 poches et 20 poches périmées préparées et conservées au niveau de la banque de sang du centre de la transfusion sanguine (CTS) de l'hôpital.

✚ **Critères d'inclusion** : sont inclus dans notre étude les CGR collectés dans des poches triples ; conservées dans une solution du CPD-SAG mannitol et qui sont débloquées après les qualifications sérologiques et immunohématologiques.

✚ **Critères d'exclusion** : à exclure toutes les poches non conformes (non bien remplies, sérologie positive, non hermétiquement fermée ...).

3. Matériel

➤ Cytomètre en flux Attune Nxt™ (Life Technologies)

Le cytomètre est composé de deux lasers:

- Un laser bleu 488nm/50mW avec quatre canaux de détection de fluorescence 530/30, 574/26, 595/40, 780/60 et un canal SSC 480/10.
- Un laser rouge 637nm/100mW avec trois canaux 670/14, 720/30 et 780/60.

Le cytomètre contient aussi un système fluide de l'Attune Nxt™ de focalisation hydrodynamique, piloté par un système acoustique (qui permet le transport des particules focalisées vers la cellule d'écoulement pour l'interrogation par le laser, il empêche l'échantillon d'entrer en contact avec les parois de la cellule à écoulement) (**Figure 9**).

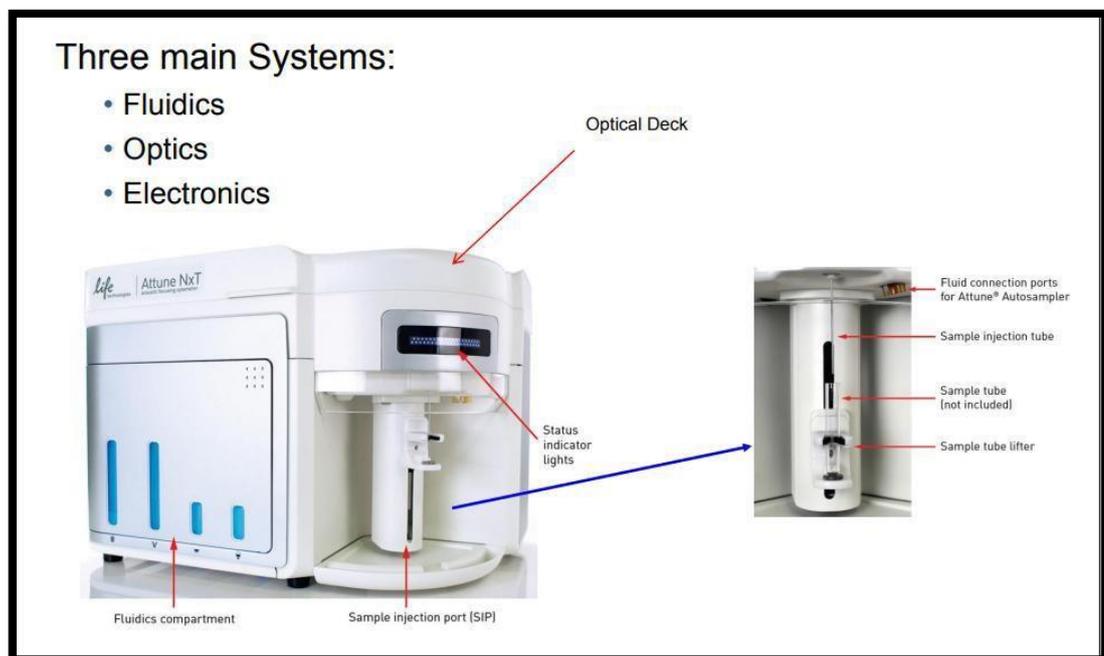


Figure 8: Cytomètre en flux (Attune Nxt™).

La mise en marche du cytomètre nécessite maintenant l'utilisation de plusieurs réactifs décrits à l'annexe 1.

- **Micropipettes.**
- **Tubes secs.**
- **Embouts jaunes et bleus à usage unique.**
- **Réfrigérateurs.**

- **Clompeuse, soudeuse de paillasse.**
- **Ciseaux.**
- **Vortex.**
- **HBSS** la solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) ; est composée de sels inorganiques et complétée par du glucose. La solution peut être utilisée pour laver les cellules et les tissus et pour maintenir les cellules dans un état viable. La solution est tamponnée avec du phosphate et maintient un pH physiologique et une pression osmotique, sa préparation est décrite à l'**annexe 2**.

4. Mode opératoire

4.1. Prélèvement des témoins

Le sang total des témoins est traité dans un délai compris entre 10 min et 4 heures après le prélèvement.

Une petite quantité de sang (1 µl) est rajoutée à 500 µl de l'HBSS pour préparer la solution 1, ensuite plusieurs tubes à différentes concentrations ont été préparés selon le **tableau 1**

Tableau 1: Différentes préparations des tubes des témoins.

| Différentes dilutions des tubes d'échantillons | Volumes de l'HBSS en µl | Volumes d'eau distillée en µl | Volumes de la solution mère en µl |
|--|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 0,9% | 900 | 0 | 10 |
| 0,6% | 600 | 300 | 10 |
| 0,5% | 500 | 400 | 10 |
| 0,45% | 450 | 450 | 10 |

- Les tubes sont vortexés avant le passage au cytomètre. Une petite incubation de 30 sec pour les tubes à différentes dilutions est indispensable avant l'aspiration de l'échantillon à l'exception du tube 0.9%.

- Taper sur Run pour démarrer les calculs et atteindre la stabilisation des globules rouges (**Figure 9 C**), puis taper sur Record jusqu'à l'arrivée du nombre d'évènement à 4000 cellules puis taper sur Stop pour lire la concentration.

- Enregistrer les concentrations de chaque tube par le système informatique du CMF pour pouvoir calculer le taux d'hémolyse de chaque patient.

- L'acquisition des données est réalisée sur un histogramme LogFSC/LogSSC (**Figure 9 A**), après élimination des doublets sur l'histogramme FSC-A/FSC-H sans aucun réglage de compensation. La vitesse d'acquisition est de 200 μ L/min avec un nombre d'évènements aux alentours de 4000.

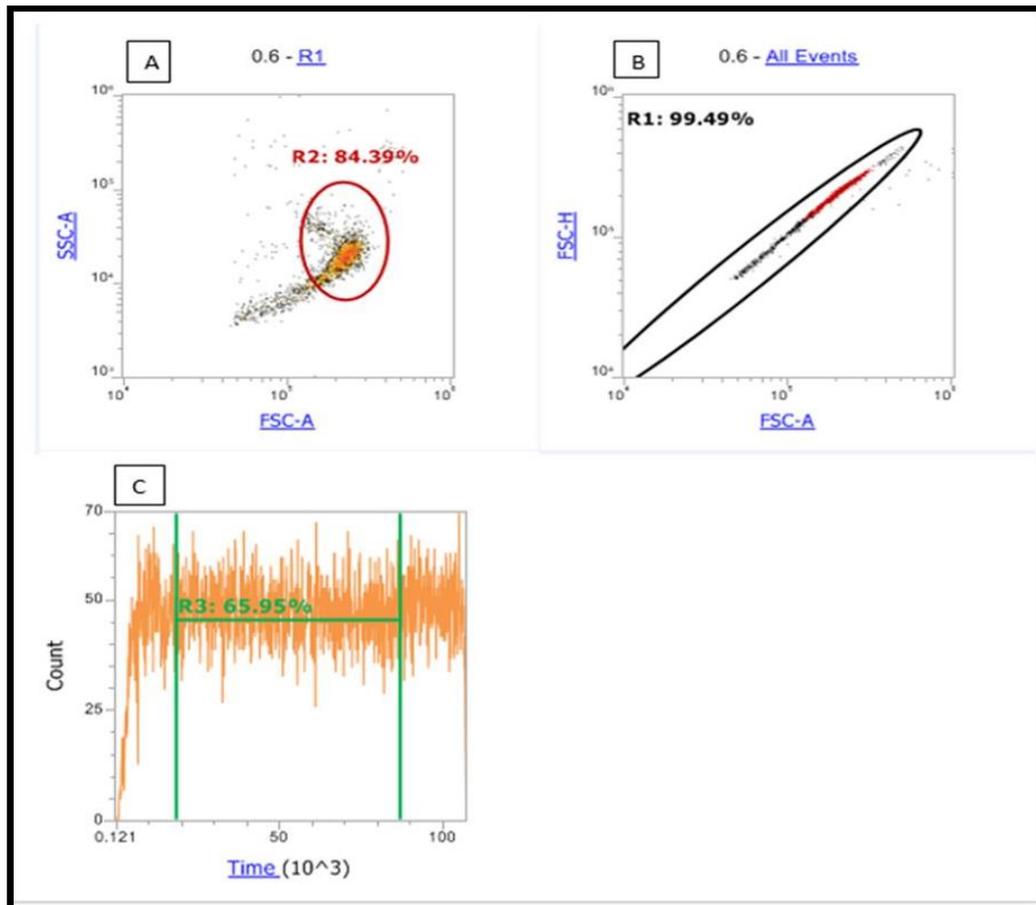
Le calcul du taux d'hémolyse est effectué par l'équation suivante:

$$Th = [(C2/C1) - 1] \times 100$$

C1: concentration des GRs à 0.9%.

C2: concentration des GRs des précédentes dilutions.

N.B. : Pour les deux dilutions (0.5% et 0.45%) ; des taux d'hémolyse très élevés ont été obtenus sur des échantillons de prélèvements des témoins (supérieur à 70% pour la dilution 0.5% et supérieur à 90% pour la dilution 0.45%). Ces taux ne permettent pas une évaluation objective de l'hémolyse anormale des CGR (difficile de différencier entre les cas pathologiques et sains), de ce fait l'analyse a été poursuivie en utilisant les deux dilutions (0.6% et 0.9%) uniquement.



A : Histogramme LogFSC/LogSSC : sélection de la population des GR selon les paramètres de taille et de structure. B : Sélection des événements isolés, élimination des cellules en doublet. C : Sélection d'un intervalle de temps dont le débit des événements est stable.

Figure 9: Méthodes d'analyse des échantillons au cytomètre.

4.2. Poches de concentrés globulaires

Les poches passent par les étapes de préparation suivantes : centrifugation du sang total, séparation, filtration puis ajout de la solution de conservation. Ce dispositif permet le recueil du concentré de globules rouges, le plasma et les plaquettes.

✓ Centrifugation

À l'issue de la centrifugation, les globules rouges seront au fond de la poche, le plasma dans la partie supérieure et la couche LP (leucoplaquettaire) entre les érythrocytes et le plasma.

✓ Séparation

L'automate-séparateur sépare le plasma, les globules rouges et la couche leucoplaquettaire. Le plasma est migré vers le haut dans une deuxième poche. Il existe deux variantes pour la séparation des érythrocytes et de la couche leuco-plaquettaire : soit la

couche est déviée dans une autre poche et le concentré érythrocytaire reste dans la poche initiale, soit le concentré érythrocytaire est décanté dans une autre poche et la couche leuco-plaquettaire reste dans la poche initiale (poche "top and bottom" qui permet de décanter vers le haut et vers le bas).

✓ **Filtration**

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

En attendant les résultats des analyses biologiques réalisées sur le don, les CGR sont stockés entre +2°C et +6°C.

Une petite quantité de sang (1 µl) est recueillie à partir des poches périmées et des poches conservées à différentes périodes (de J₁ jusqu'à J₂₅) par la technique de stripping:

- La tubulure connectée à la poche a été vidée ensuite le contenu de la poche du sang est homogénéisé par retournements successifs.

- A l'aide d'une soudeuse de paille, un petit segment de la tubulure a été séparé pour transférer son contenu dans un tube sec.

Les dilutions, la lecture des concentrations des tubes à 0.9% et 0.6% et les calculs ont été réalisés de la même manière précédente décrite ci-dessus.

5. Analyse statistique

Les résultats ont été saisis sur le logiciel Microsoft Excel puis transférés vers le logiciel IBM SPSS V.22. Un calcul de la moyenne, la déviation standard et l'intervalle de confiance à 95% a été effectué.

Les moyennes ont été comparées par le test t de Student pour des échantillons indépendants, le risque est fixé à 5%. Et une comparaison a été faite entre le taux d'hémolyse des poches au cours de différentes semaines (S1/S2/S3) par le test khi-deux.

Résultats

1. Etudedescriptivedespopulationsd'étude

Notresérieestconstituéedusangde20patientsprélevédansdestubesEDTAet de 72 poches de CGR préparés au niveau du CTS de l'hôpital militaire régionaluniversitaire de Constantine (HMRUC) pendant la période s'étendant du mois de Marsau mois de Juin2023.

1.1. Répartitiondestémoins

Ils'agitdesprélèvementsréalisésurdestubesEDTApour20patientsdisponiblesauni veaudulaboratoire,lesprélèvementsontétéréalisés touslesjoursdela semaine.

1.2. Répartitiondespoches

Dans cette dernière on a analysé 72 poches de CGR dont 20 poches périmées, lespochessontrépartiesselonleurduréedeconservation aumomentd'analyseen 4groupes.

Tableau2:Répartitiondespoches.

| Différentstypesdepoches | Duréeen jours | Effectifdespoches |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| Pochesdelapremièresemaine(S1) | J ₁ -J ₇ | 29 |
| Pochesdeladeuxièmesemaine(S2) | J ₈ -J ₁₅ | 10 |
| Pochesdelatroisièmesemaine(S3) | J ₁₆ -J ₂₅ | 13 |
| Pochespérimées | ≥ J ₄₂ | 20 |

Le **Tableau2** montre la répartition de l'effectif des poches sur les des différentessemaines. La durée maximale de conservation des poches du sang est de 42 jours, lanon disponibilité des poches d'au-delà de 25 jours est expliqué par son utilisation danslesdifférents servicesdel'hôpital.

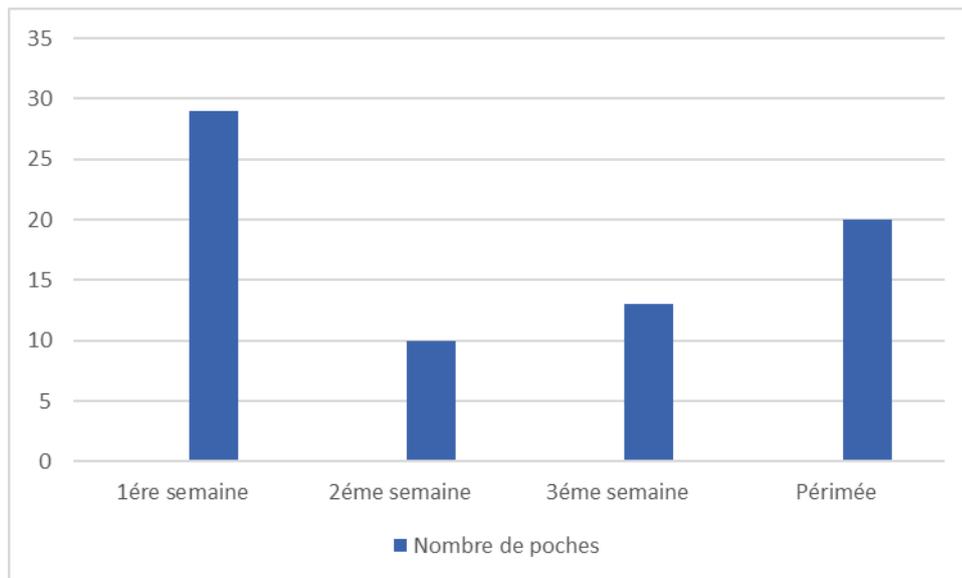


Figure 10: Représentation graphique de la répartition des poches.

D’après ce graphe on remarque que la première semaine contient le plus grand effectif des poches (29 poches), suivie des poches périmées (plus de 42 jours). Enfin la deuxième semaine représente l’effectif le plus réduit.

1.3. Moyenne du taux d’hémolyse des témoins

La moyenne des valeurs du taux d’hémolyse chez les témoins est de 28.45% avec un écart type de 12.81%. La valeur minimale est 7% et la maximale est 46%.

L’application du test de Kolmogorov-Smirnov a donné une valeur de $P > 0.05$, ceci prouve que la distribution des valeurs des témoins suit la loi normale.

Après la confirmation de la normalité de la distribution, on peut fixer une valeur seuil à partir de la relation suivante:

$$\text{La valeur seuil} = \text{Moyenne} \pm 2 \times \text{Ecart type.}$$

Ceci donne une valeur seuil égale à 54%, par conséquent n’importe quelle valeur supérieure à 54% est considérée comme cas pathologique.

1.4. Moyenne du taux d’hémolyse des poches

La moyenne et l’écart-

type des valeurs du taux d’hémolyse des poches sont représentés au **Tableau 4**.

Tableau3: Moyennes et écart-types des poches.

| Statistique Poches | Effectif des poches | Moyenne | Ecart type |
|-----------------------|---------------------|---------|------------|
| Semaine1 | 29 | 25.86 | 15.86 |
| Semaine2 | 10 | 39.90 | 13.40 |
| Semaine3 | 13 | 53.54 | 29.04 |

On remarque que la semaine S1 contient 29 poches avec un taux d'hémolyse faible, suivi de la Semaine S2 contenant 10 poches avec un taux d'hémolyse élevé.

La semaine S3 Semaine3 représente la moyenne du taux d'hémolyse le plus élevé.

2. Etude analytique

2.1. Comparaison de la moyenne du taux d'hémolyse entre les différentes semaines

Des comparaisons ont été réalisées entre les moyennes du taux d'hémolyse de trois semaines pour suivre l'évolution de ce paramètre au cours du temps.

Le Test-t de Student est appliqué afin d'évaluer les différences entre les moyennes.

2.1.1. Comparaison entre la semaine S1 et la semaine S2

Tableau4: Comparaison de la moyenne du taux d'hémolyse entre les semaines S1/S2.

| | S1 | S2 |
|-------------|--------|--------|
| Moyenne | 25.86% | 39.90% |
| Ecart-type | 15.86% | 13.40% |
| Valeur du P | 0.0156 | |

Le **Tableau 4** montre que le p-value du test t appliqué sur les moyennes du taux d'hémolyse pour les deux semaines S1 et S2 (1ère Semaine/2ème semaine) est inférieur à 0.05 ce qui prouve qu'il existe une différence statistiquement significative.

2.1.2. Comparaison entre la semaine S1 et la semaine S3

Le résultat de la comparaison des moyennes d'hémolyse entre S1 et S3 est représenté au **tableau 5**. Il existe une différence statistiquement significative ($P < 0.05$) entre les valeurs des deux semaines de comparaison.

Tableau5: Comparaison de la moyenne du taux d'hémolyse entre les semaines S1/S3.

| | S1 (%) | S3 (%) |
|-------------|--------|--------|
| Moyenne | 25.86 | 53.54 |
| Ecart-type | 15.624 | 29.045 |
| Valeur du P | 0.005 | |

2.2. Comparaison selon les CGR dépassant le taux normal d'hémolyse

2.2.1. Comparaison entre la semaine S1 et la semaine S2

Le **tableau6** montre le pourcentage des poches de sang qui ont un taux d'hémolyse inférieur à 54% (poches négatives), ceux qui ont un taux d'hémolyse supérieur à 54% (poches positives) et l'ensemble de ces derniers.

Le test d'indépendance de khi-deux a été appliqué pour réaliser la comparaison entre les différentes semaines et les valeurs du P sont représentées aux tableaux 6 et 7.

Tableau6 : Comparaison du taux d'hémolyse entre S1/S2.

| | S1(Effectifs(%)) | S2(Effectifs(%)) |
|------------------|------------------|------------------|
| Poches négatives | 28 (96%) | 9 (90%) |
| Poches positives | 1 (4%) | 1 (10%) |
| Valeur du P | 0.452 | |

La valeur du P est supérieure à 0.05, ce qui montre qu'il n'existe pas une différence significative entre l'effectif des poches présentant un taux d'hémolyse pathologique des deux semaines S1 et S2.

2.2.2. Comparaison entre la semaine S1 et la semaine S3

Tableau7 : Comparaison du taux d'hémolyse entre S1/S3

| | S1(Effectifs(%)) | S3(Effectifs(%)) |
|------------------|------------------|------------------|
| Poches négatives | 28 (96%) | 8 (61%) |
| Poches positives | 1 (4%) | 5 (38%) |
| Valeur du P | 0.007 | |

D'après la valeur du P (0,007) du **Tableau 7** ; on déduit que l'effectif des poches positives augmente d'une manière très significative à la semaine S3 en comparaison à la semaine S1, ceci nous a conduit au calcul de l'estimation du risque d'avoir un taux d'hémolyse pathologique à la troisième semaine.

Le calcul réalisé pour l'estimation du risque d'avoir un taux d'hémolyse supérieur à 54% a donné une valeur de 17,5 avec un intervalle de confiance à 95% [1,78, 172,17], ceci montre qu'il existe 17,5 fois plus de risque d'avoir une poche avec un taux d'hémolyse supérieur à 54% à la troisième semaine en comparaison à la première semaine.

2.3. Analyse des poches périmées

Le taux d'hémolyse de 20 poches périmées (plus de 42 jours) a été calculé, la **Figure 14** représente l'évolution du taux d'hémolyse des poches périmées en fonction du temps jusqu'à atteindre 100%. La moyenne du taux d'hémolyse est de $76\% \pm 22.08\%$, On remarque que 80% des poches périmées représente un taux d'hémolyse supérieur à 54%.

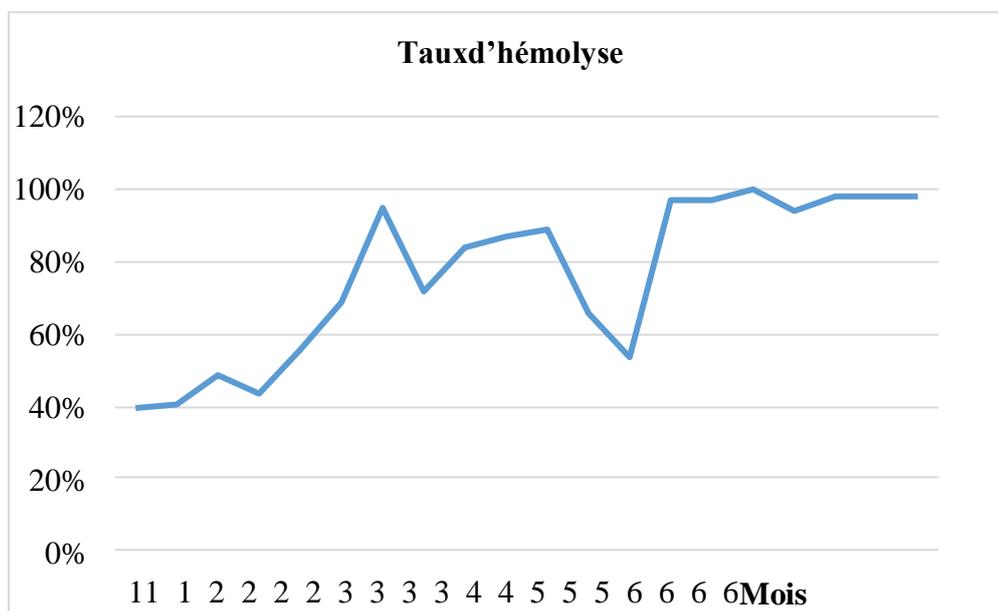


Figure 11: Représentation graphique du changement du taux d'hémolyse en fonction du temps.

3. Analyse de cas particuliers

Le test de la fragilité membranaire par CMF a été appliqué sur des prélèvements sanguins de trois cas pathologiques présentés à l'hôpital militaire. Les résultats obtenus ont montré un taux d'hémolyse inférieur à la normale (4%) pour le cas d'un nouveau-né représentant une thalassémie, et des taux d'hémolyse supérieurs à la normale pour deux cas représentant une anémie hémolytique 89% et 98%.

Discussion

L'objectif de notre étude était la mise au point d'une nouvelle technique d'évaluation de la fragilité des GR par cytométrie en flux, et son application dans le contrôle de la qualité des concentrés de globules rouges (CGR) stockés au niveau de la banque du sang du CTS de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine.

Les CGR préparés dans une solution de CPD-SAGM peuvent être conservés jusqu'à 42 jours ; au-delà de cette durée les GR deviennent fragiles et s'hémo lysent ce qui rend le CGR non conforme à la transfusion sanguine. L'altération de l'état des GR conservés est due à un processus physiologique du vieillissement des GR, mais il est également influencé par plusieurs paramètres relatifs à l'état initial du donneur de sang et la méthode de préparation et de conservation des CGR:

-Pour la bonne sélection médicale du donneur : un questionnaire minutieux et un examen clinique sont réalisés pour s'assurer de l'état de santé du donneur et de son aptitude à donner du sang.

-Pour une bonne préparation et conservation des CGR : le respect strict de toutes les bonnes pratiques transfusionnelles en matière du prélèvement de donneur, agitation des poches, et acheminement à l'unité de fractionnement dans le délai recommandé, ainsi que la recommandation relative à la centrifugation et le fractionnement pour la préparation du CGR. Une fois préparé le CGR doit être immédiatement conservé à +4°C, afin de limiter au maximum le métabolisme des globules rouges et allonger ainsi leur durée de conservation, toute rupture de la chaîne de froid entraîne une altération de l'état des globules rouges et une hémolyse précoce.

Afin de contrôler les étapes de préparation et de conservation des CGR, on applique actuellement le test de mesure du taux d'hémolyse à la fin de la conservation, mais l'inconvénient de ce test réside dans la difficulté de sa réalisation et la mauvaise reproductibilité, en outre, il détermine l'étape finale de tout un processus de destruction des GR, et il ne donne pas d'enseignement sur l'état des globules rouges non hémolysés.

Le développement d'un test biologique qui peut prédire une fragilité des globules rouges conservés a un intérêt majeur dans la promotion de la transfusion sanguine. Dans cette étude ; une évaluation de la résistance des GR aux solutions hypotoniques a été appliquée par cytométrie en flux dérivée de l'épreuve classique de la résistance globulaire (RG) aux solutions hypotoniques pour l'étude des anomalies

membranaires des GR. Cette dernière est une technique très laborieuse peu spécifique et peu reproductible, en comparaison à la cytométrie en flux qui est une technique optimisée afin d'améliorer les performances et réduire le coût et le temps.

1. Test de la fragilité membranaire par cytométrie en flux

Le test de fragilité par cytométrie en flux est basé sur la détermination de la diminution du nombre des GR dans le temps contrairement au test classique de la résistance globulaire qui mesure le taux d'hémoglobine libérée après l'hémolyse.

Le développement de cette technique est basé sur la capacité du cytomètre Attune NxT à déterminer la concentration et le nombre des cellules par méthode volumétrique directe. Le nombre total des GR avant l'hémolyse est déterminée dans une solution 0.9% en HBSS (solution isotonique), ensuite le pourcentage des globules rouges hémolysés a été déterminé après la mesure d'un nombre de globules rouges résiduels dans une solution à 0.6% en HBSS dilué par l'eau distillée. Le choix de la concentration 0.6% a été fait d'une manière à rendre le test plus sensible à la fragilité des globules rouges. Une solution à un pouvoir hypotonique important comme 0.5% ou 0.45% risque d'induire une hémolyse même des globules rouges normaux tandis qu'une solution à un faible pouvoir hypotonique 0.8% ou 0.7% risque d'avoir un résultat négatif même pour les globules rouges fragiles. Avant d'analyser les CGR, le test a été appliqué sur une population témoin afin de déterminer le taux d'hémolyse normal qui était à 54% calculé sur la base de la moyenne obtenue + 2 écart-type.

Le stockage des CGR est effectué dans une solution CPD-SAG Mannitol, Le SAGM (sodium, adénine, glucose, mannitol) est la solution de conservation la plus utilisée en Europe. Elle contient du chlorure de sodium (NaCl) pour l'équilibre osmotique, du glucose, substrat de la glycolyse érythrocytaire, de l'adénine pour la synthèse des nucléotides et du mannitol jouant un rôle osmotique, de piégeage des radicaux libres et de stabilisation de la membrane (Roussel C. et al., 2020). Plusieurs études ont prouvé son efficacité et ont confirmé que les GR stockés avec la solution CPD-SAGM sont d'une qualité supérieure et pourraient circuler et survivre plus longtemps après la transfusion (Almizraq R. et al., 2013, Barros I. et al., 2021).

Lors de cette étude ; l'analyse était effectuée sur 72 poches ; la majorité des analyses effectuées sur le CGR se situent aux trois premières semaines de conservation des poches, cela montre que la majorité des CGR sont distribués dans les premiers

jours après leur préparation. L'effectif des poches de plus de 25 jours était absent en rapport avec la distribution et la livraison de ces poches par le CTS pour les différents services demandeurs.

2. Comparaison des moyennes du taux d'hémolyse obtenus

Une différence statistiquement significative a été observée entre les moyennes du taux d'hémolyse des deux semaines S1/S2. Ceci montre une augmentation du taux d'hémolyse avec le temps et une meilleure résistance des globules rouges à l'hémolyse au cours de la semaine S1 en comparaison à la S2.

Une différence significative a été remarquée ; entre les moyennes du taux d'hémolyse des semaines S1 et S3, ce qui montre que la force de résistance contre l'hémolyse des globules rouges a diminué au cours de la semaine S3 en comparaison à celle de la semaine S1.

À partir de notre étude on remarque que le taux d'hémolyse augmente avec le temps ; ce résultat a été confirmé par **Stein E., (2020)** au cours de son étude réalisée sur la fragilité osmotique des concentrés des globules rouges (CGR) au cours du stockage au sein du laboratoire d'Hématologie au CHRU de Nancy. L'auteur a remarqué une augmentation progressive du taux d'hémolyse, lors d'un suivi du vieillissement des concentrés érythrocytaires dans des conditions de stockage identiques en mesurant la fragilité osmotique de neuf CGR à J+1, J+20 et J+40 de stockage (**Stein E., 2020**).

Dans la littérature, plusieurs études se sont intéressées à la fragilité osmotique des concentrés érythrocytaires au cours de leur stockage, les résultats de ces études ont montré une fragilité osmotique augmentée de façon significative pendant le stockage (**D'Alessandro A. et al., 2015, Roussel C. et al., 2017, Berezina T. et al., 2002**).

Blasi B. et al., ont mis en évidence une relation entre la durée de stockage, l'altération morphologique des érythrocytes et la fragilité osmotique. Cette dernière peut être expliquée par une atteinte morphologique (ratio surface/volume diminué) principalement due à l'altération du métabolisme énergétique des érythrocytes (diminution en ATP, acidose, augmentation de la concentration en calcium) ainsi qu'à l'oxydation (attaques oxydatives des protéines structurales) (**Blasi B. et al., 2012**).

3. Analyse des poches périmées

Il existe 80% des poches périmées ayant dépassé le taux normal d'hémolyse (54%), ce résultat montre que les CGR après leur date de péremption (42 jours) devient

très fragile, et ne présente aucune résistance contre l'hémolyse malgré le respect des bonnes conditions de conservation.

Dans notre étude, on a trouvé une poche d'une durée de 6 mois de conservation, cette dernière a présenté un taux d'hémolyse de 100%, ce qui confirme que le temps a une grande influence sur l'état des globules rouges.

Il a été documenté dans plusieurs études que la durée de conservation des CGR varie de trois à sept semaines, en fonction des pays et des réglementations locales. Cependant, de nombreuses études réalisées *in vitro* montrent que la qualité des GR ne reste pas stable durant le stockage, ce qui pourrait avoir un impact négatif sur le receveur, ces études ont suggéré la présence d'un effet délétère important de la transfusion de GR stockés plus de 14 jours (**Koch C. et al., 2008**). La lésion de stockage désigne l'ensemble des altérations métaboliques, biochimiques et morphologiques des GR (cités ci-dessus) dont l'amplitude augmente avec la durée de conservation.

4. Comparaisons selon les CGR dépassant le taux normal d'hémolyse

Notre objectif dans cette étape est de suivre la conformité des CGR, d'après nos résultats il semble que certains CGR sont impactés par un taux d'hémolyse supérieur à 54% aux premières semaines de stockage (S1 et S2) et que ce risque augmente d'une manière significative à la troisième semaine par un facteur 17,5.

Le fait d'avoir certaines poches moins impactées que d'autres par le stockage peut être expliqué par le processus de préparation des CGR qui pourrait avoir un impact sur les érythrocytes. Il est à noter qu'*in vivo* les globules rouges sont en équilibre avec leur environnement. Dès la collection du don, le traitement *ex vivo* du sang total affecte très probablement les érythrocytes (**Bardyn M. et al., 2018**), étant donné que leur milieu extracellulaire se trouve modifié (**Abonnenc M. et al., 2018**).

En effet, au cours des différentes étapes de préparation du sang en CGR, les globules rouges sont soumis à de nouvelles conditions, telles qu'une modification de pH, une mise en suspension dans la solution anticoagulante et dans la solution de conservation, une variation de température ainsi qu'un stress mécanique (centrifugations), ce qui pourrait affecter la fragilité d'une partie des érythrocytes (**Stein E., 2020**).

5. Analyse des cas particuliers

Cette technique développée peut avoir des domaines d'applications autres que le contrôle de qualité des PSL. Parmi ces domaines c'est le diagnostic des anomalies congénitales de la membrane érythrocytaire par conséquent, ce test a été appliqué sur quelques cas d'anomalies membranaires:

Cas 1 : La thalassémie est en rapport avec la présence d'un taux élevé de l'hémoglobine F induisant une résistance à la lyse, HbF rend les GR plus résistants à l'hémolyse.

N.B. : la plupart des cas représentant un taux d'hémolyse inférieur à 54% sont des sujets sains, l'obtention d'un taux d'hémolyse inférieur à 54% reflète une anomalie comme dans notre cas (thalassémie).

Cas 2/3 : L'anémie hémolytique est causée par une l'anomalie membranaire, ceci rend les globules rouges non résistants contre l'hémolyse (fragilité membranaire), ce qui nous aide à différencier entre les cas pathologiques et sains.

L'anémie hémolytique secondaire à une anomalie membranaire est confirmée par cette technique, en effet il a été prouvé que la CMF pourrait représenter un complément d'investigation dans le diagnostic de l'anémie hémolytique (**Michel M., 2013**).

La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse révolutionnaire, composée de plusieurs tests notamment : le test de résistance globulaire et le test de la fragilité membranaire qui a été utilisé dans notre étude. Ce dernier permet l'évaluation de l'état des GR, ou l'analyse d'une seule poche ne prend que 3 à 5 min, ce qui marque sa rapidité, par rapport aux techniques classiques de l'étude de la résistance globulaire où le temps nécessaire peut aller jusqu'à 24 heures.

L'étude de la fragilité des GR par la technique de CMF est très efficace et non coûteuse en effet ; elle n'implique la consommation que d'un seul réactif (l'HBSS). L'efficacité de la CMF est confirmée par **Sainte-Laudy J. et al.**, dans leur étude consistant à l'évaluation de la cytométrie en flux par rapport aux tests de provocation pour le diagnostic de l'allergie alimentaire chez l'enfant en 2009 (**Sainte-Laudy J. et al., 2009**).

Conclusion

Le but de notre travail était d'étudier la fragilité de la membrane érythrocytaire par lacytométrie en flux. Notre étude est basée sur deux épreuves : la bonne sélection médicale du donneur et la bonne préparation et conservation des CGR, réalisés au niveau de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine (HMRUC). Ces deux épreuves permettent de fournir des renseignements plus précis sur l'état des GR au cours de leur conservation.

Nous avons montré grâce à la fragilité osmotique que la préparation des CGR impacte la fragilité des globules rouges, de même que le stockage. Certaines poches semblent toutefois moins impactées que d'autres par le processus de préparation et par le stockage. Durant la conservation des CGR, les GR subissent des modifications membranaires au cours de leur vieillissement. Ceci s'est montré très significatif au cours de la troisième semaine de stockage ou le risque de développer un taux d'hémolyse élevé était très significatif.

Il est à noter que cette technique requiert des améliorations tels que la détermination du nombre des GR avant l'ajout de l'eau distillée et l'utilisation d'un tampon commercialisé plus stable.

Outre la nécessité d'augmenter les effectifs, cette étude devra investiguer l'utilité de lacytométrie en flux dans le dépistage des anomalies membranaires des GR (ex: anémie hémolytique et la thalassémie). De plus, en raison de sa simplicité, sa rapidité et sa sensibilité ; il serait intéressant d'évaluer son intérêt pour une meilleure efficacité transfusionnelle surtout pour les patients polytransfusés. En effet ; l'utilisation de cette technique permettra de garantir la qualité et la sécurité de la transfusion et donc d'améliorer le rendement transfusionnel.

De plus, des recherches ultérieures pourront mettre le point sur l'importance de la variabilité entre les donneurs et l'intérêt de la mise au point de nouveaux marqueurs, corrélés à l'efficacité transfusionnelle, pour l'évaluation de la qualité du stockage en utilisant cette technique.

Annexes

Annexe01

Réactifsducytomètreenflux(AttuneNxt™)

- **Attune focusing fluid** : est un réactif de support stérile, tamponné et sans azide qui contient un surfactant qui aide à nettoyer les lignes fluidiques du cytomètre à focalisation, il a été conçu pour minimiser la formation de bulles et pour empêcher l'accumulation de matériau cellulaire dans la cellule d'écoulement, ce qui réduit le colmatage de l'instrument.

- **Attune**

wash solution: la solution de lavage a été formulée pour éliminer les débris cellulaires, empêcher l'accumulation de protéines et minimiser l'adhérence des colorants aux lignes fluidiques du système. Il est recommandé de l'utiliser pendant la maintenance de routine et les procédures d'arrêt automatique du cytomètre à focalisation acoustique AttuneNxt™.

- **Attune shut down solution** : la solution d'arrêt Attune Nxt™ est un tampon de nettoyage utilisé dans la procédure d'arrêt automatique du cytomètre à focalisation acoustique AttuneNxt™.

Annexe02

Préparation del'HBSS

La solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) ; est composée de sels inorganiques et complétée par du glucose. La solution peut être utilisée pour laver les cellules et les tissus et pour maintenir les cellules dans un état viable. La solution est tamponnée avec du phosphate et maintient un pH physiologique et une pression osmotique.

Mode opératoire :

- Remplissage d'une fiole jaugée de 1 l avec 800 ml de l'eau distillée.

- L'ajout successif de :

- 8 g de NaCl.
- 400 mg de KCl.
- 140 mg de CaCl₂.
- 100 mg de MgSO₄-7H₂O.
- 100 mg de MgCl₂-6H₂O.
- 60 mg de Na₂HPO₄-2H₂O.
- 60 mg de KH₂PO₄.
- 1 g de D-Glucose (Dextrose).
- 350 mg de NaHCO₃.

- Agitation pour bien mélanger la solution, après avoir bouché la fiole.

- L'ajout de l'eau distillée avec la pipette jusqu'à 1 litre.

- La fiole jaugée est ensuite rebouchée et retournée plusieurs fois.

-

Placer la fiole sur l'agitateur avec ajout du barreau magnétique et laisser homogénéiser pendant 20 minutes.

- Conservation à une température (+4°C).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abonnenc, M., Tissot, J.-D., & Prudent, M. (2018). General overview of blood products in vitro quality: Processing and storage lesions. *Transfusion Clinique et Biologique*, 25(4), 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2018.08.162>.

Alaterre, Elina. (2020). Identification fine des cellules plasmocytaires normales et tumorales dans la moelle osseuse de patients atteints de myélome multiple en cytométrie en flux [Montpellier]. <https://theses.hal.science/tel-02502295>.

Almizraq, R., Tchir, J. D. R., Holovati, J. L., & Acker, J. P. (2013). Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality: RMPs and RBC quality measures. *Transfusion*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/trf.12080>.

Autissier Patrick. (2010). Phénotypage des cellules immunitaires par cytométrie en flux multiparamétrique : un outil indispensable dans l'immunopathologie du sida [conservation nationale des arts et métiers]. <https://theses.hal.science/tel-00555509>.

B

Bakary D. (2019). Aspect épidémiologique, clinique et biologique de la transfusion sanguine. [Université des Sciences, Faculté de Médecine et d'Odontologie des Techniques et des Technologies stomatologie (FMOS) de Bamako (USTTB)]. <https://www.bibliosante.ml/bitstream/handle/123456789/2077/19M118.pdf;jsessionid=15833E31B15F77138A50B7592FE6225A?sequence=1>.

- Bardyn, M., Tissot, J.-D., & Prudent, M. (2018).** Oxidative stress and antioxidant defenses during blood processing and storage of erythrocyte concentrates. *Transfusion Clinique et Biologique*, 25(1), 96-100. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2017.08.001>.
- Barger, A. M. (2022).** Erythrocyte Morphology. In M. B. Brooks, K. E. Harr, D. M. Seelig, K. J. Wardrop, & D. J. Weiss (Éds.), *Schalm's Veterinary Hematology* (1^{re} éd., p. 188-197). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119500537.ch24>.
- Barros, I. O., Sousa, R. S., Tavares, M. D., Rêgo, R. O., Firmino, P. R., Souza, F. J. A., Abrantes, M. R., Minervino, A. H. H., Araújo, C. A. S. C., Ortolani, E. L., et Barrêto Júnior, R. A. (2021).** Assessment of Donkey (*Equus asinus africanus*) Whole Blood Stored in CPDA-1 and CPD/SAG-M Blood Bags. *Biology*, 10(2), 133. <https://doi.org/10.3390/biology10020133>.
- Bassot Louis. (2018).** Evaluation de la cytométrie en flux pour le suivi de la maladie résiduelle des leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant [Rouen Normandie UFR santé]. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01932674v1/document>.
- Beauplet, A., Courbil, R., et Ouazan, J.-M. (2013).** Médecine transfusionnelle : Le modèle français. J. Libbey Eurotext.
- Berezina, T. L., Zaets, S. B., Morgan, C., Spillert, C. R., Kamiyama, M., Spolarics, Z., Deitch, E. A., & Machiedo, G. W. (2002).** Influence of Storage on Red Blood Cell Rheological Properties. *Journal of Surgical Research*, 102(1), 6-12. <https://doi.org/10.1006/jsre.2001.6306>.
- Blasi, B., D'Alessandro, A., Ramundo, N., & Zolla, L. (2012).** Red blood cell storage and cell morphology. *Transfusion Medicine*, 22(2), 90-96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2012.01139.x>.

C

Chiche,E.,&Caulier,A.(2018).Hemoglobinopathiesandhemolyticanemias.Hématologie, 24(2),169-182. <https://doi.org/10.1684/hma.2018.1370>.

Ciepiela, O., Adamowicz-Salach, A., Zgodzińska, A., Łazowska, M., et Kotuła, I. (2018).Flow cytometric osmotic fragility test: Increased assay sensitivity for clinical applicationin pediatricematology:Flow cytometric osmoticfragility testin children.CytometryPart B:ClinicalCytometry,94(1),189-195.<https://doi.org/10.1002/cyto.b.21511>.

CISSE Hamidou. (2018). Evaluation de la mesure du taux d'hémoglobine par l'HemoCue® Hb301 par rapport à l'automate d'hématologie ABX Micros ES60 au sein d'une cohorte àKalifabougou.Université dessciencesdestechniquesetdestechnologiesdebamako.

Ciudad Marion.(2022). Équilibre des populationslymphocytaires Tau cours de l'anémiehémolytiqueauto-immune[bourgognefranche-comté].<https://theses.hal.science/tel-03947267v1/document>.

D

D'Alessandro, A., Kriebardis, A. G., Rinalducci, S., Antonelou, M. H., Hansen, K. C.,Papassideri, I. S., & Zolla, L. (2015). An update on red blood cell storage lesions, asgleaned through biochemistry and omics technologies: An omics update on RBC storage.Transfusion,55(1),205-219.<https://doi.org/10.1111/trf.12804>.

Danic B. (2005). Énoncer les conditions d'un don du sang standard et les motifs d'exclusion.Établissementfrançaisdusang-Bretagne,ruePierre-Jean-Gineste,BP91614,35016Rennescedex,France.[https://doi.org/10.1016/S1246-7820\(05\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S1246-7820(05)00056-X).

De Oliveira, S., & Saldanha, C. (2010). An overview about erythrocyte membrane. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 44(1), 63-74. <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1253>.

Diallo Lamine, Aldiouma Guindo, Ibrahima Kéita, Mohamed Ag Baraïka, Abdoul Karim Dembélé, Boubacari Ali Touré, Dapa Aly Diallo. (2022). Taux des plaquettes sanguines en phase intercritique et expressivité clinique de la drépanocytose dans un centre de référence de la drépanocytose au Mali. 9.

Didelon Jacques. (2001). Automatisation et validation d'un test de fragilité des hématies par hémolyse lente. Institut national polytechnique de Lorraine.

E

Elleuch H. (2004a). Cytométrie en flux. Centre Régional du Transfusion Sanguin, Sfax.

Elleuch H. (2004b). Epreuve de sciences de base question numéro 24 physiologique du globule rouge et physiopathologies des anémies. Centre Régional du Transfusion sanguine ; sfax.

F

Fouquet Guillemette. (2019). Régulation de l'érythropoïèse : Rôle des récepteurs à la transferrine et de l'œstrogène [Paris-Saclay]. https://theses.hal.science/tel-02527171/file/87889_FOUQUET_2019_archivage.pdf.

François Yaya. (2021). Propriétés physiques des globules rouges en agrégation. GRENOBLE ALPES.

Fritz Shirley. (2017). Cyrométrie en flux des microparticules : Application à la thrombopénie induite par l'héparine. aix marseille.

H

HERMANN.H,CIER.J.F.(1976).Précisdephysiologie(4èmeédition). masson.

J

Judith AO., Johansson SG., Hourihane JO., Bousquet J., Bruijnzeel-Koomen C., DreborgS.,(2013).Immunologie :Allergiehypersensibilitéetinflammationchronique(7thédition).W.H.freemanandcompany.

K

kaushansky,Lichtman,Prchal,Levi,Press,Burns,Caligiuri,K.,Marshall,Josef,Marcel,Oliver,Linda,Michael.(2015).Williams Hematology(9èmeédition).

Kim,H.-C.,JangT.-W.,Chae,H.-J.,Choi,W.-J.,Ha,M.-N.,Ye,B.-J.,Kim,B.-G.,Jeon, M.-J., Kim, S.-Y., & Hong, Y.-S. (2015). Evaluation and management of lead exposure. *AnnalsofOccupationalandEnvironmentalMedicine*,27,30.<https://doi.org/10.1186/s40557-015-0085-9>.

K

Koch, C. G.,Li,L., Sessler,D. I.,Figuroa, P.,Hoeltge,G. A.,Mihaljevic, T.,&Blackstone, E. H. (2008). Duration of Red-Cell Storage and Complications after Cardiac Surgery. *New England Journal of Medicine*,358(12), 1229-1239.<https://doi.org/10.1056/NEJMoa070403>.

L

LEVY.J-P.(2004).Hématologieettransfusion.

Lokwani,D.P.(2013).TheABCofCBC:Interpretationofcompletebloodcountandhistograms(Firstedition).Jaypee BrothersMedicalPublishers(P)Ltd.

M

Matherat Gabriel. (2018). Caractérisation fonctionnelle du facteur CXXC5 (RINF) au cours del'hématopoïèse normaleetpathologique[UniversitéParisDescartes].file:///C:/Users/Del/Ddownloads/va_Matherat_Gabriel.pdf.

Michel, M. (2013). Diagnostic d'une anémie hémolytique en réanimation. *Réanimation*, 22(5),477-489.<https://doi.org/10.1007/s13546-013-0710-y>.

MohabeerKavish.(2018).Nouveloutil d'analyseencytométrieenflux :Applicationàl'immunophénotypage dela LLC.Bordeaux.

O

Oltova,J.,Svoboda,O., Machonova,O.,Svatonova,P.,Traver,D.,Kolar,M.,& Bartunek, P. (2020). Zebrafish Kit ligands cooperate with erythropoietin to promote erythroid cellexpansion. *Blood Advances*, 4(23), 5915-5924.<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001700>.

Q

QuévalR,PagotE,SyllaS,MaillardC.(1989).Résistanceglobulaire deshématies bovines.

R

ROliviaHAJJARépouseKIRSCH.(2020).

Optimisationdu diagnosticdesphérocytosehéréditaire.laurraine.

Rampal Patrick, Laurent Beaugerie, Philippe Marteau, Gérard Corthier. (2000).

Colitesinfectieusesdel'adulte.J.LibbeyEurotext.

Roussel,C.,Buffet,P.,&Amireault,P.(2020). Conserverlesglobulesrougespourlatransfusion.Revu
efrancophonedeslaboratoires,2020(525),52-58.[https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(20\)30275-6](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(20)30275-6).

Roussel, C., Dussiot, M., Marin, M., Morel, A., Ndour, P. A., Duez, J., Le Van Kim, C.,Hermine, O., Colin, Y., Buffet, P. A., et Amireault, P. (2017). Spherocytic shift of red blood cells during storage provides a quantitative whole cell-based marker of the storagelesion:spherocyticshiftofRBCsduringstorage.transfusion,57(4).1007-1018.<https://doi.org/10.1111/trf.14015>.

Rouviere Julie-Anne. (2008). Diagnostic de la sphérocytose héréditaire par cytométrie en flux.laurraine.

S

Sainte-Laudy, J., Ménétrey, C., Brianchon, C., Lienhardt-Roussie, A., & Cogné, M. (2009).Évaluation de la cytométrie en flux par rapport aux tests de provocation en simple insupour le diagnostic de l'allergie alimentaire chez l'enfant. Revue française d'allergologie,49(6),454-461.<https://doi.org/10.1016/j.reval.2009.05.002>.

Samson Adewoyin, A., Adeyemi, O., Omolola Davies, N., et Abiola Ogbenna, A. (2019). Erythrocyte Morphology and Its Disorders. In A. Tombak (Éd.), Erythrocyte. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86112>.

Schuppe Laurie. (2018). Etude des marqueurs biologiques influençant le recueil de cellules souches hématopoïétiques dans le cadre de l'autogreffe. Limoges.

Smaili.Farida. (2003). Abrégé d'hématologie (O.P.U).

Steiger,A.(2015). Point de vue Hématologie.

Stein E. (2020). Concentrés de globules rouges et lésions de stockage : Analyse par l'osmocells (SD innovation), évaluation de la fragilité osmotique au cours du stockage. [lorraine]. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03298182/document>.

Sultan Claude, Gouault-Heilmann M, Imbert M, C., M, M. (1996). Aide-mémoire d'hématologie.

T

Tahiri Najim. (2013). Stimulation de globules rouges modèles, et analyse analytique de modèles de suspensions très concentrées. Mohammed VRabat.

Thiam, L., Dramé, A., Coly, I. Z., Diouf, F. N., Seck, N., Boiro, D., Ndongo, A. A., Basse, I., Niang, B., Deme-Ly, I., Sylla, A., Diagne, I., et Ndiaye, O. (2017). Profils épidémiologiques, cliniques et hématologiques de la drépanocytose homozygote SS en phase inter critique chez l'enfant à Ziguinchor, Sénégal. Pan african medical journal, 28. <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.28.208.14006>.

Thierry Idziorek^{1,4}, Julie Cazareth², Catherine Blanc³, Nathalie Jouy^{1,4}, Pierre Bourdely², et Aurélien Corneau. (2018). Que la lumière soit. Etsi ce n'était plus seulement vrai ! Evolution de la cytométrie : Du conventionnel à la masse (en passant par le spectre).

Tissot, J.-D., Garraud, O., Danic, B., Cabaud, J.-J., et Lefrère, J.-J. (2013). [Ethics and blood transfusion]. *Transfusion clinique et biologique: Journal de la société française de transfusion sanguine*, 20(4), 423-439. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2013.06.003>.

V

Valensi F. (2005). Morphologie des cellules sanguine normale.

Vanbergen, O., White, G. R., Helbert, M., Singh, V., & Gargani, Y. (2018). Crash course: Haematology and immunology (Fifth edition). Elsevier.

vault Sofie, Labie Dominique. (2011). Lesb-thalassémies. Espoirs thérapeutiques de l'hepcidine. Institut Cochin, 24, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

W

Wang Xiong. (1990). Influence de l'agrégation érythrocytaire sur les protéines mécaniques du sang. Application à certaines pathologies. Lorraine.

Z

Zafrani L, Monneret G. (2017). Comprendre la cytométrie en flux. 519. <https://doi.org/10.1007/s13546-017-1317-5>.

Zatout,S.(2002).Réalisationdemicrocapillairesetcaractérisationdeladéformabilitédesglobulesrouge
s.M'hamedBougara-Boumerdes.

Sites

webWeb:

https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Repr%C3%A9sentation_simplifi%C3%A9_de_l%27h%C3%A9moglobine_et_de_l%27h%C3%A8me.jpgTéléchargéle25/04/2023.

Résumés

Résumé

La membrane des globules rouges est l'un des constituants principaux des globules rouges. Plusieurs techniques ont été utilisées pour détecter la fragilité membranaire des érythrocytes à savoir: le pink test et le test de résistance globulaire.

L'objectif de la présente étude était l'évaluation de la fragilité des globules rouges par la cytométrie en flux et son application dans le contrôle de la qualité des concentrés des globules rouges (CGR).

Une analyse par le cytomètre en flux Attune Nxt™ (Life Technologie) suivi d'un calcul du taux d'hémolyse ont été réalisés sur des CGR des poches de donneurs de sang à différentes semaines de conservation et des prélèvements sanguins considérés comme témoins.

L'analyse du taux d'hémolyse des témoins a permis de déterminer le taux d'hémolyse normal qui était à 54% calculé sur la base de la moyenne obtenue + 2 écart-type. Une différence statistiquement significative a été observée entre les moyennes du taux d'hémolyse des semaines S1/S2 et S1/S3. Ceci montre une augmentation du taux d'hémolyse avec le temps et une meilleure résistance des globules rouges à l'hémolyse au cours de la semaine S1 en comparaison aux deux semaines S2 et S3.

D'après nos résultats il semble que certains CGR sont impactés par un taux d'hémolyse supérieur à 54% aux premières semaines de stockage (S1 et S2) et que ce risque augmente d'une manière significative à la troisième semaine par un facteur 17,5.

La cytométrie en flux (CMF) est une technique rapide facilitant l'étude de la fragilité membranaire des érythrocytes qui est impactée par la préparation des CGR et la durée de stockage.

Mots-clés: Globule rouge – cytométrie en flux – fragilité – membrane.

Abstract

The red blood cell membrane is one of the main constituents of red blood cells. Several techniques have been used to detect the membrane fragility of erythrocytes, namely: the pink test and the globular resistance test.

The objective of the present study was the evaluation of the fragility of red blood cells by flow cytometry and its application in the quality control of packed red blood cells (RBCs).

An analysis by the flow cytometer Attune Nxt™ (Life Technology) followed by a calculation of the hemolysis rate were carried out on RBCs of blood donor bags at different weeks of storage and blood samples considered as controls.

Analysis of the hemolysis rate of the control tubes made it possible to determine the normal hemolysis rate, which was 54% calculated on the basis of the average obtained + 2 standard deviations. A statistically significant difference was observed between the average hemolysis rate of weeks S1/W2 and S1/W3. This shows an increase in the rate of hemolysis with time and a better resistance of red blood cells to hemolysis during week S1 compared to the two weeks S2 and S3.

According to our results, it seems that some RBCs are impacted by a hemolysis rate greater than 54% in the first weeks of storage (S1 and S2) and that this risk increases significantly in the third week by a factor of 17.5.

Flow cytometry (CMF) is a rapid technique facilitating the study of erythrocyte membrane fragility, which is impacted by RBC preparation and storage time.

Keywords: Red globule–flow cytometry–fragility–membrane.

Année universitaire: 2022-2023

Présenté par: Bouderbala Randa

Aimar Aya Amira

Etude de la fragilité membranaire des érythrocytes par la cytométrie en flux.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Résumé

La membrane des globules rouges est l'un des constituants principaux des globules rouges. Plusieurs techniques ont été utilisées pour détecter la fragilité membranaire des érythrocytes à savoir : le pink test et le test de résistance globulaire.

L'objectif de la présente étude était l'évaluation de la fragilité des globules rouges par la cytométrie en flux et son application dans le contrôle de la qualité des concentrés des globules rouges (CGR).

Une analyse par le cytométrie en flux Attune Nxt™ (Life Technologie) suivi d'un calcul du taux d'hémolyse ont été réalisés sur des CGR des poches de donneurs de sang à différentes semaines de conservation et des prélèvements sanguins considérés comme témoins.

L'analyse du taux d'hémolyse des tubes témoins a permis de déterminer le taux d'hémolyse normal qui était à 54% calculé sur la base de la moyenne obtenue + 2écart-type. Une différence statistiquement significative a été observée entre les moyennes du taux d'hémolyse des semaines S1/S2 et S1/S3. Ceci montre une augmentation du taux d'hémolyse avec le temps et une meilleure résistance des globules rouges à l'hémolyse au cours de la semaine S1 en comparaison aux deux semaines S2 et S3.

D'après nos résultats il semble que certains CGR sont impactés par un taux d'hémolyse supérieur à 54% aux premières semaines de stockage (S1 et S2) et que ce risque augmente d'une manière significative à la troisième semaine par un facteur 17,5.

La cytométrie en flux (CMF) est une technique rapide facilitant l'étude de la fragilité membranaire des érythrocytes qui est impactée par la préparation des CGR et la durée de stockage.

Mots-clefs : Globule rouge–cytométrie en flux–fragilité–membrane.

Laboratoire d'hémodiagnostic et CTS de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine.

Encadreur 1 : Moussaoui Samira (M.C.B -Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur 2 : Zouitene Raouf (M.C.B -Université Salah Bounider , Constantine 3).

Présidente : Medoukali Imane (M.C.B-Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examinatrice : Abed Nousseiba (M.C.A-Université Frères Mentouri, Constantine 1).