

Développement d'une nouvelle méthode de déshydratation des plaquettes sanguines par zéodratation

Thibault DONNET ^{1,2}

Sous la direction de Francine RENDU ¹

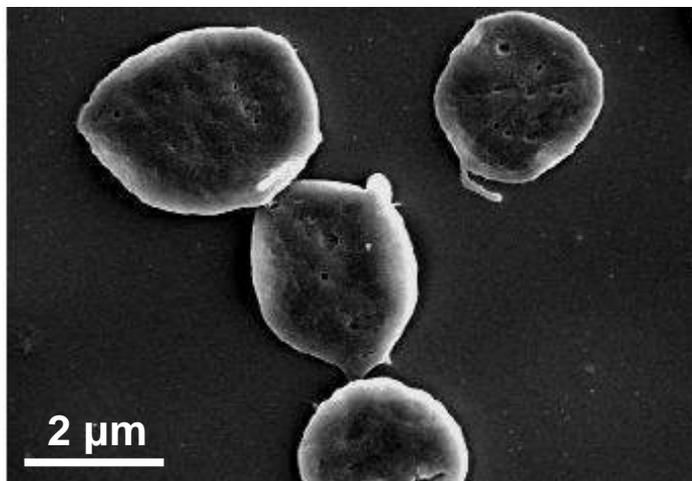
1^{er} Février 2013

¹ INSERM UMRS_956 / UPMC, Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière, Paris, France

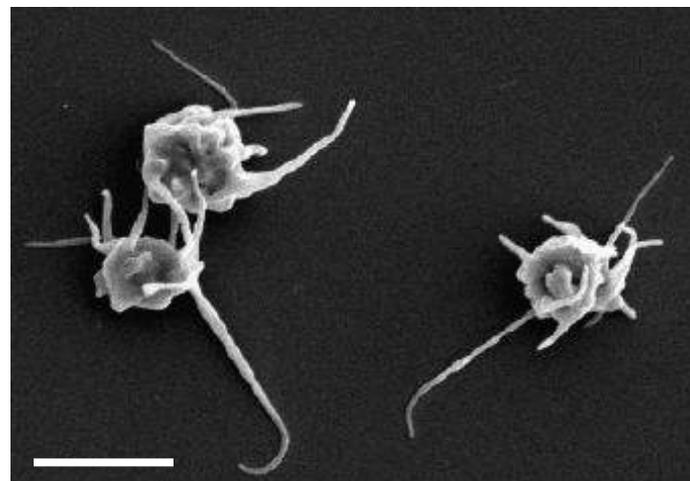
² INSERM UMRS_949 / EFS Alsace, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

- 1. La plaquette sanguine et la fonction hémostatique**
- 2. La transfusion des plaquettes sanguines : contexte**
- 3. La méthode de zéodratation**
- 4. Les Z_plt : caractérisation *in vitro* et capacité hémostatique *in vivo***
- 5. Conclusions et perspectives**

La plaquette : morphologies et fonctions



Plaquettes au repos



Plaquettes activées

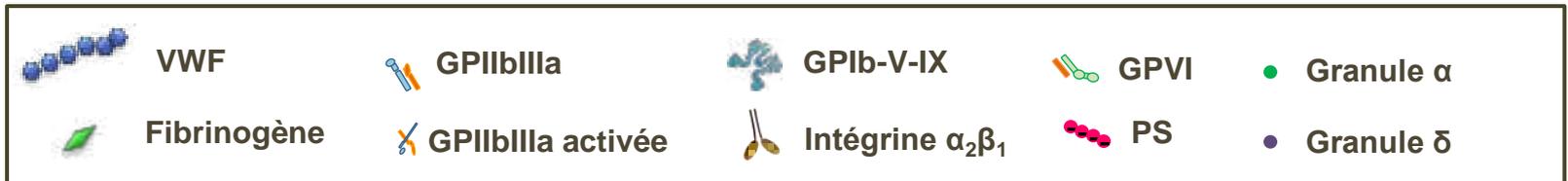
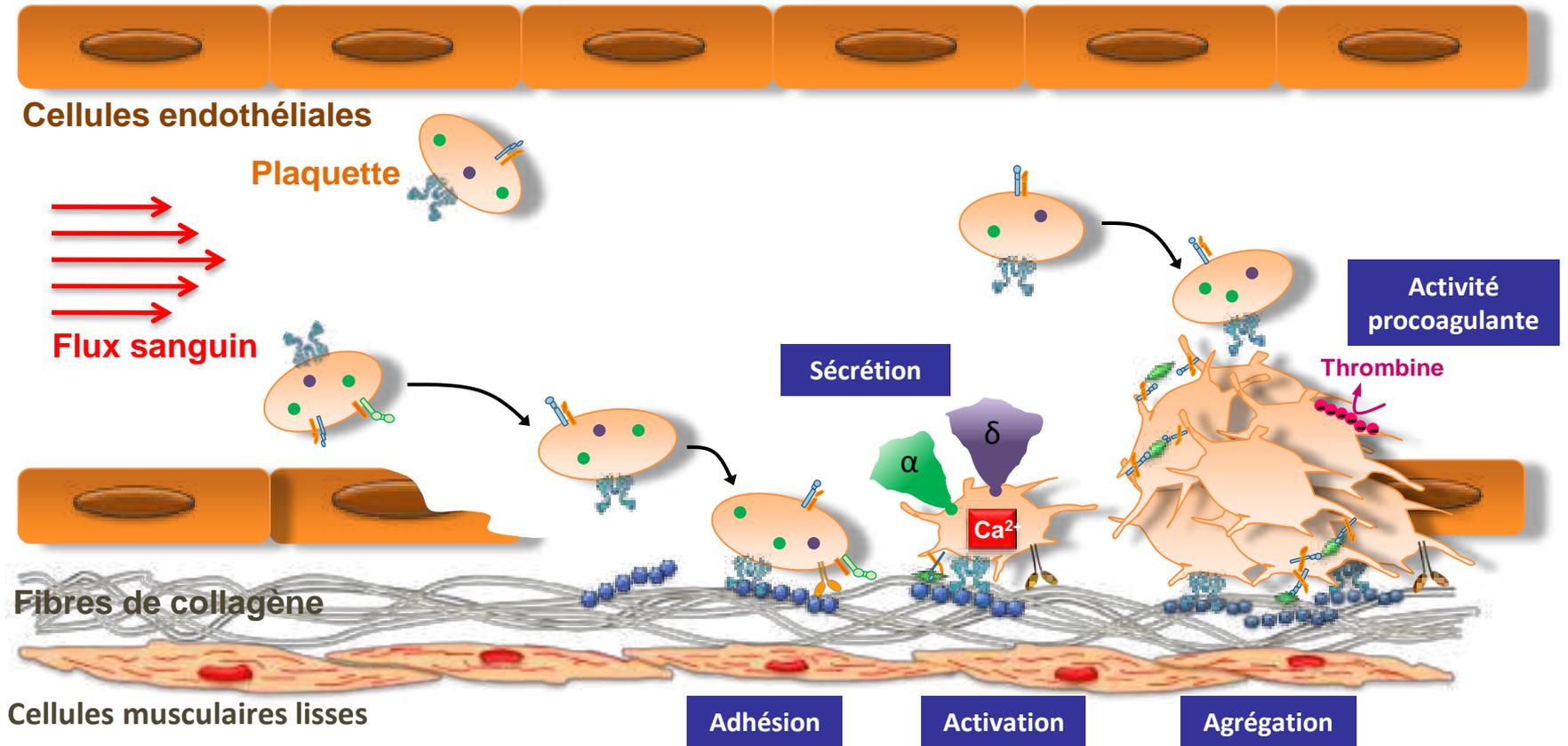
UMRS_949, A. Eckly

Directement impliquées dans le maintien de l'intégrité vasculaire par les mécanismes de l'hémostase primaire

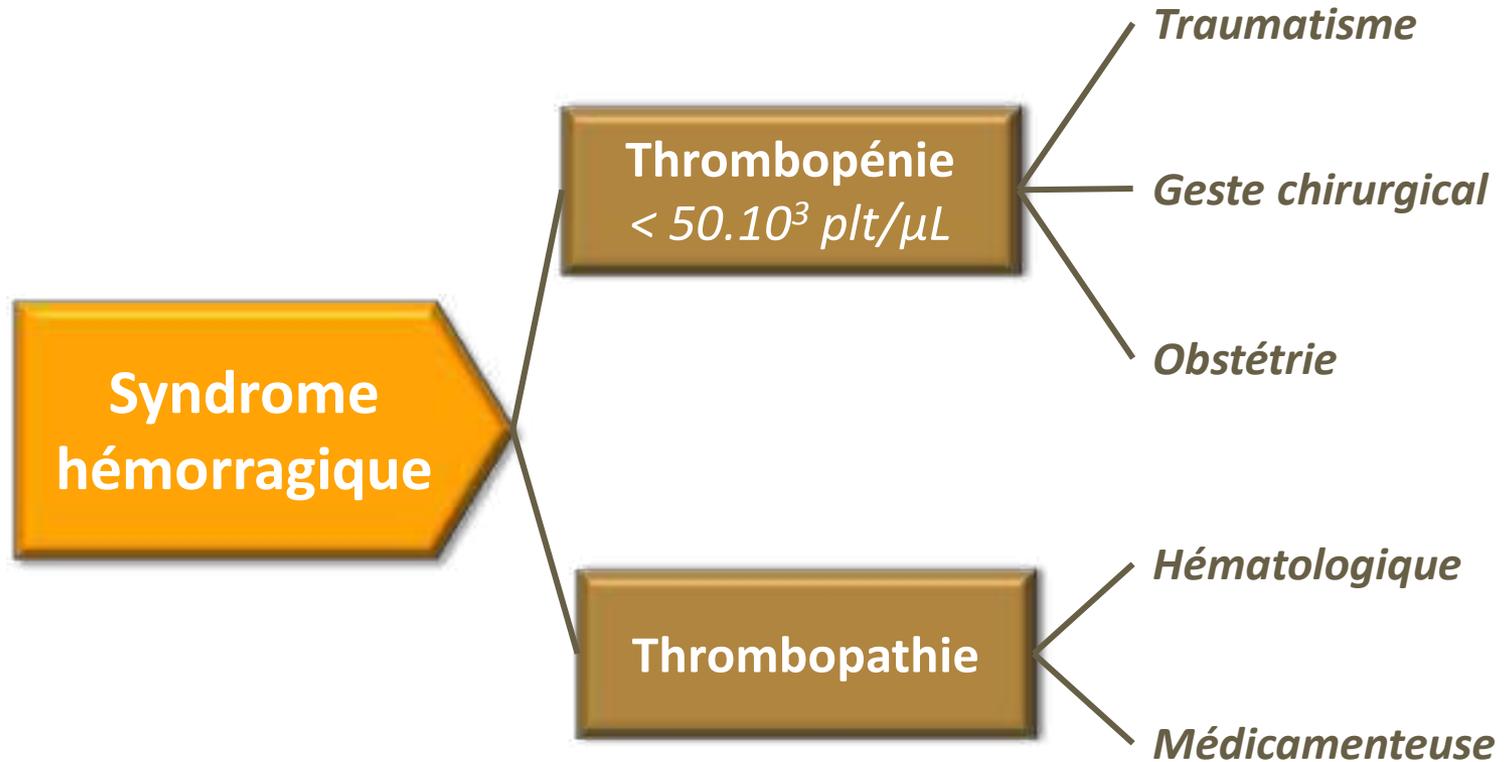
Nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques :

- Thrombose et athérosclérose
- Réponses immunitaires et inflammation
- Développement des métastases
- Angiogenèse

L'hémostase primaire



Pourquoi transfuser les plaquettes sanguines ?



La conservation des plaquettes

Conditions réglementaires

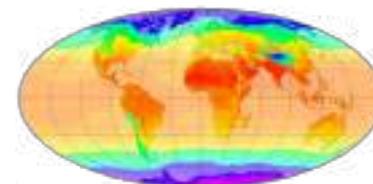


- 5 jours
- 22 ± 2 °C
- agitation constante

Situations exceptionnelles



Médecine d'urgence



Climats
non-tempérés

Stockage

Transport

Disponibilité

Le développement de produits plaquettaires stockables

Les produits d'origine plaquettaire

Froid (+ 4°C)

- Moyen terme : **jours**
- ➔ Activité hémostatique nulle

Pour revue : Vostal *et al.*, *Transfus Med Rev*, 1997

Congélation (-20/-80°C)

- Long terme : **mois**
- Utilisation de **cryoprotectant** (> 5% DMSO)
- ➔ Activité hémostatique moyenne/faible

European Committee on Blood Transfusion, 2010

Lyophilisation

- Très long terme : **années**
- Utilisation de DMSO et/ou **fixateur** (> 1,8% PFA)
- ➔ Activité hémostatique non démontrée

Read *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995

Les produits de substitution

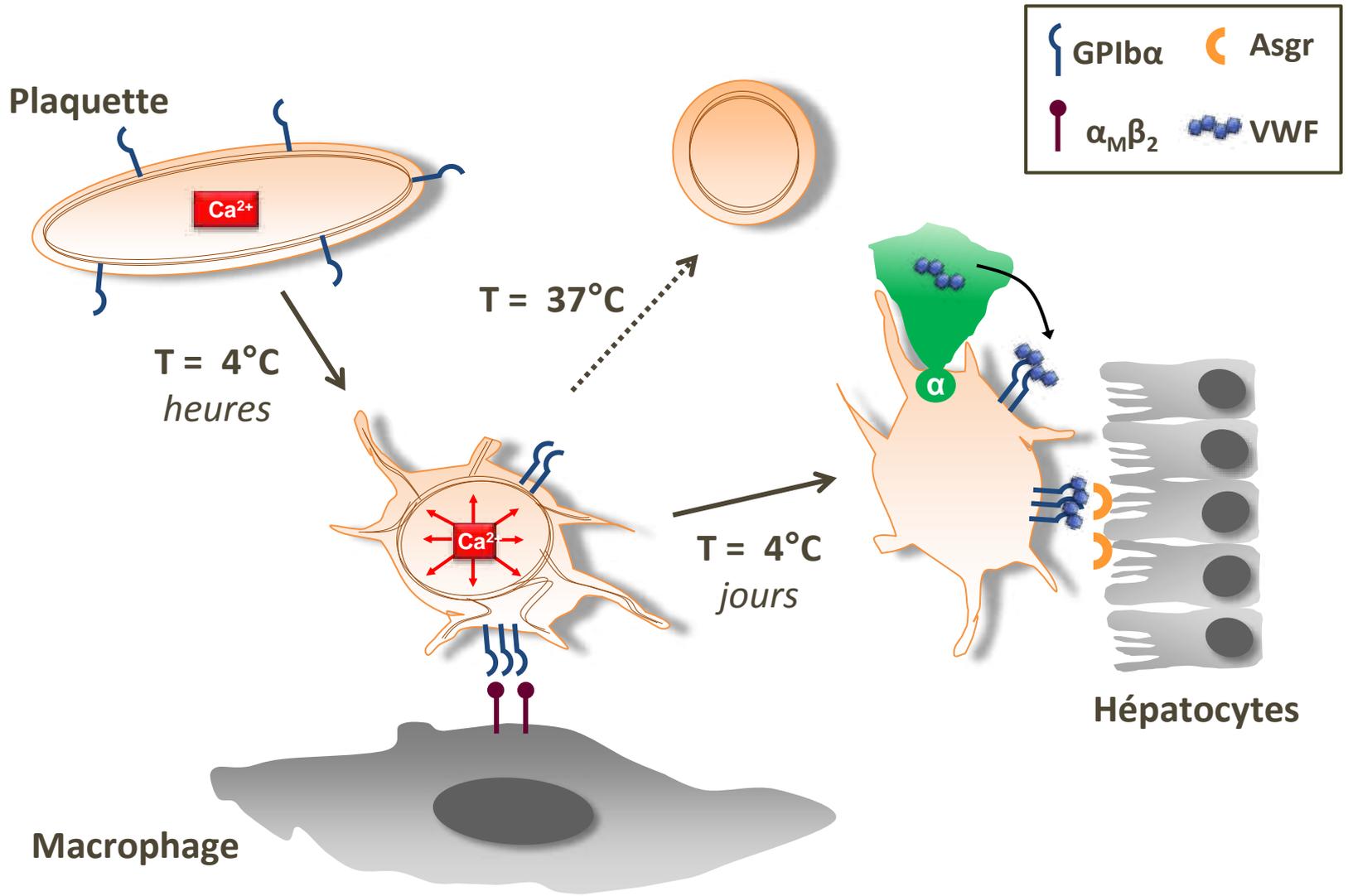
Les particules (GR, liposomes, billes) portant des motifs antigéniques plaquettaires

Pour revue : Okamura *et al.*, *Transfusion*, 2009

La production de plaquettes *in vitro*

Dunois-Lardé *et al.*, *Blood*, 2009

Clairance des plaquettes exposées au froid



But du travail : application de la zéodratation

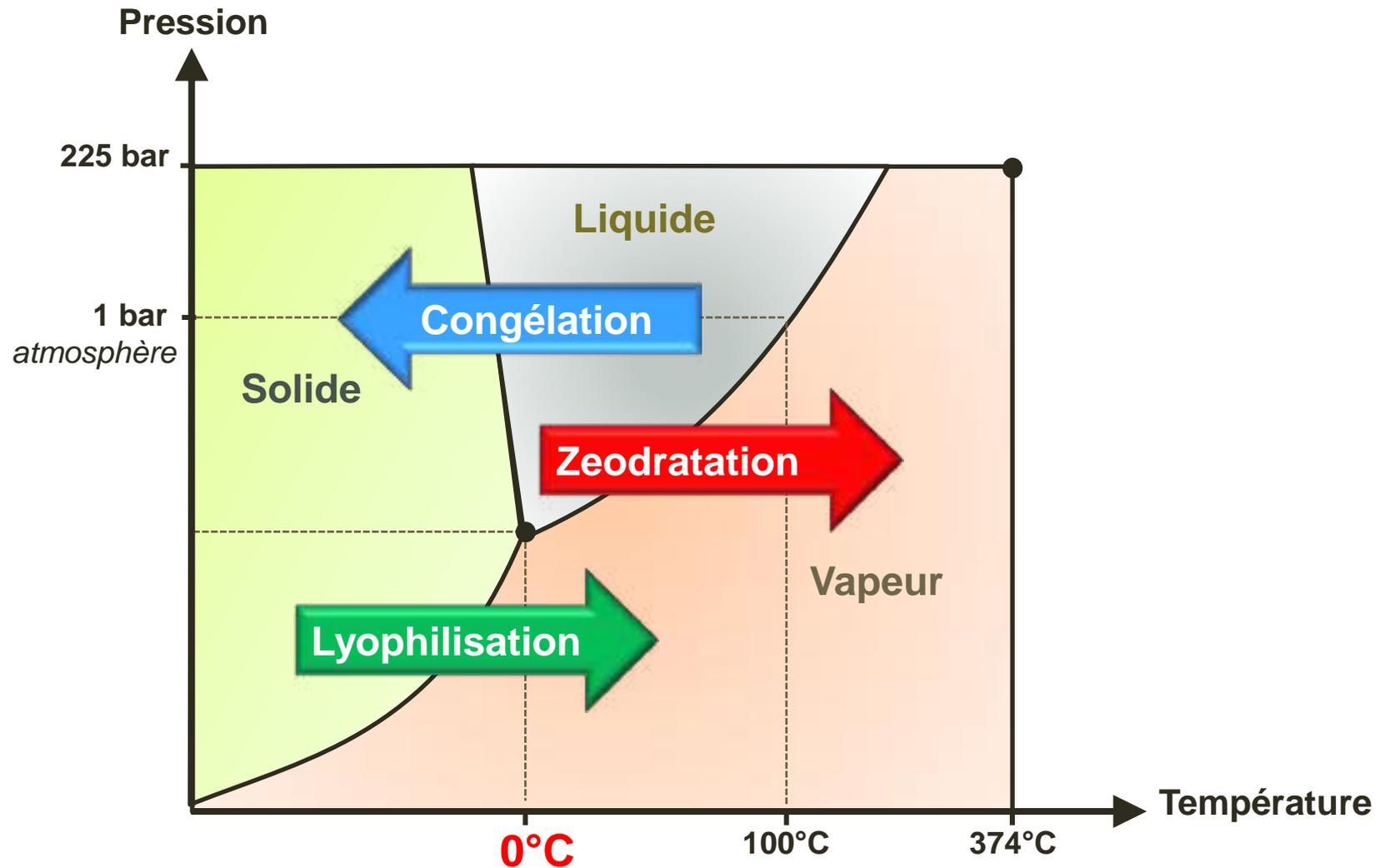
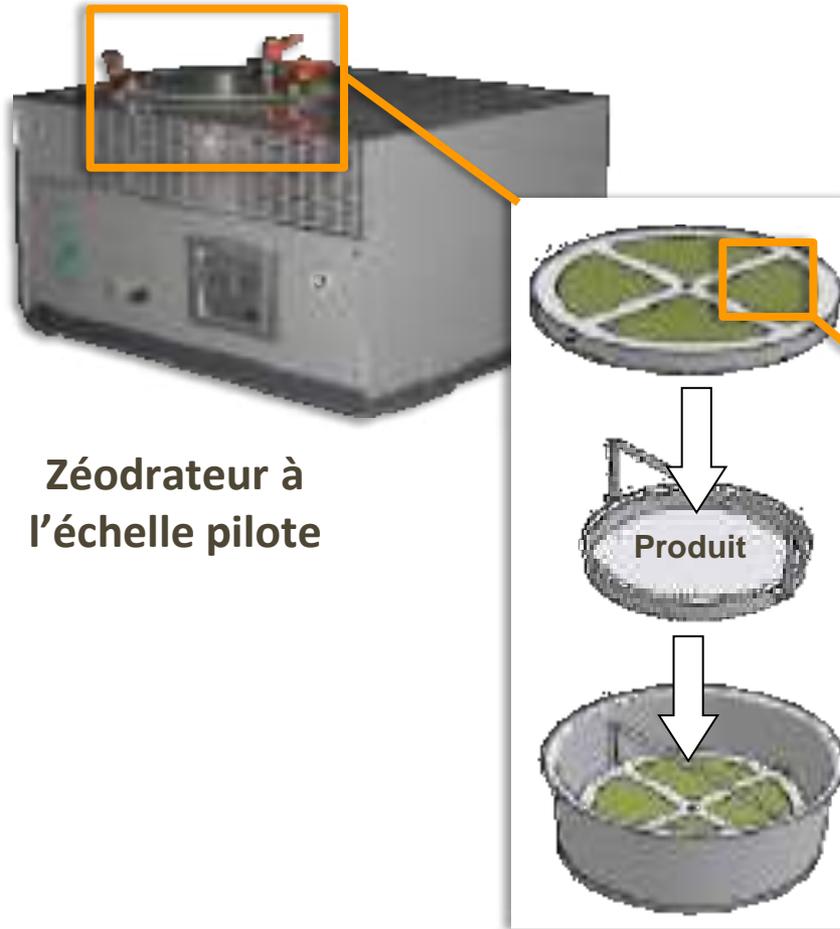


Diagramme de changement de phase de l'eau pure

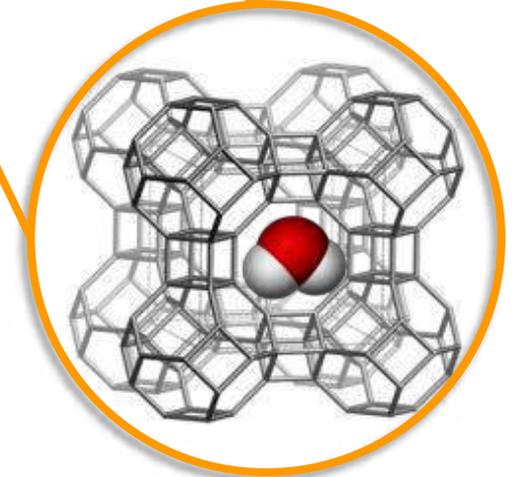
Le procédé de zéodratation



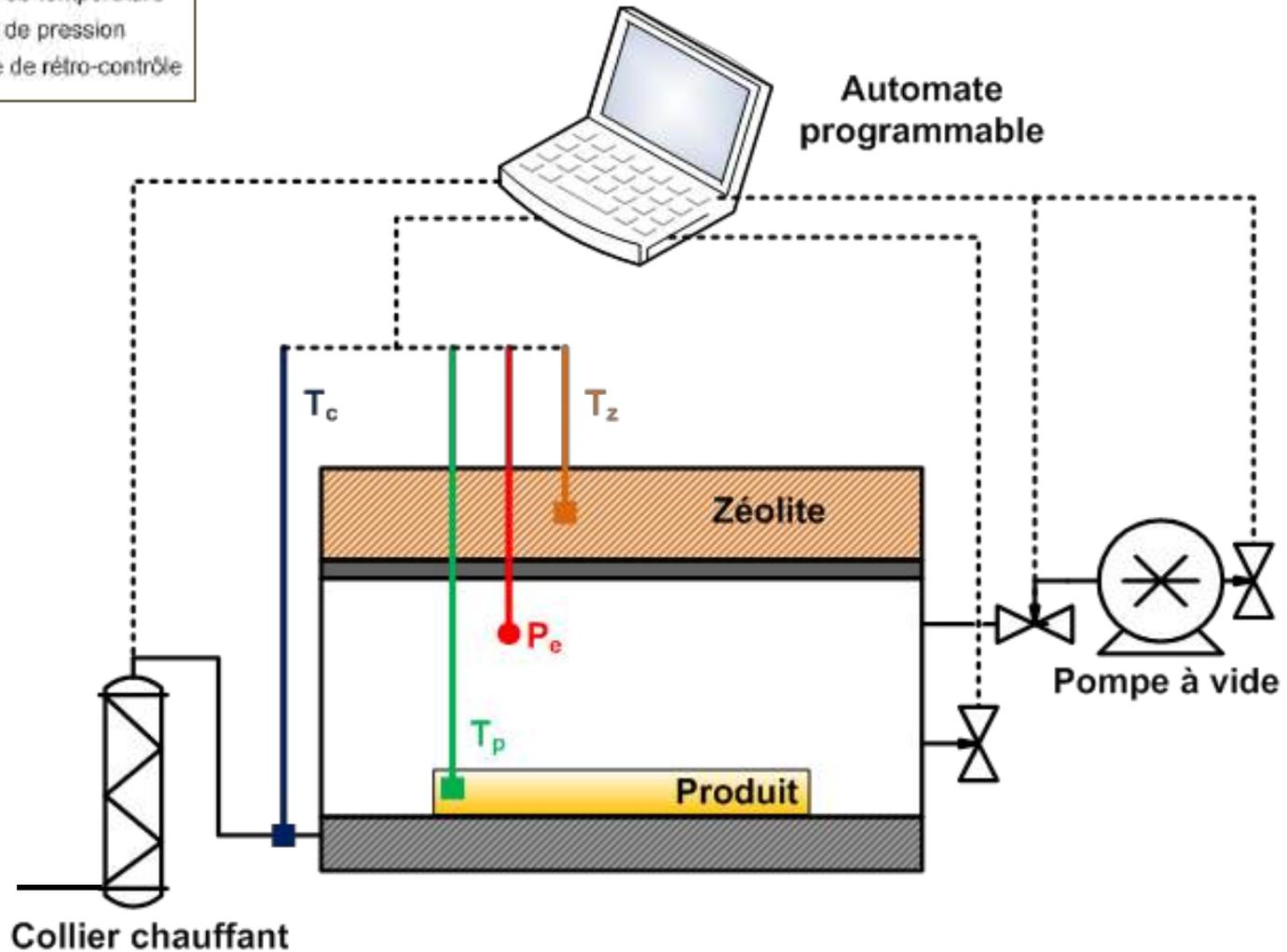
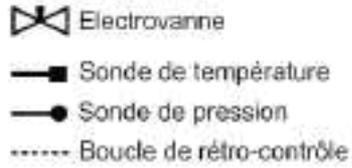
Billes de zéolite A
(\varnothing 1.5 mm)



$\varnothing_{\text{pores}} : 4 \text{ \AA}$

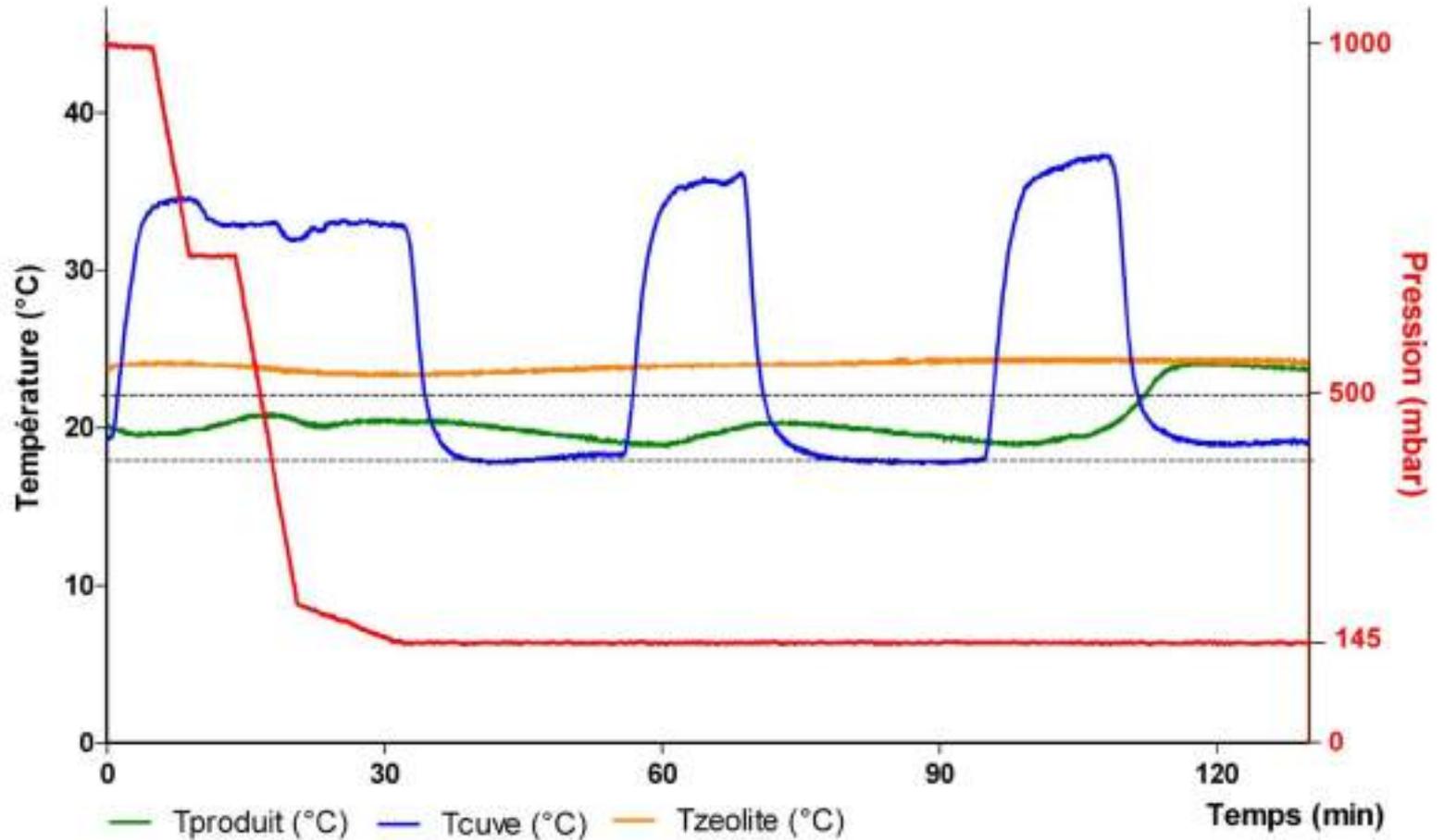


Zéodrateur pilote : contrôle/commande



Profil thermodynamique

Volume ≈ 2 mL



Rendu F, Donnet T, Gachet C, Cazenave JP, Zeodration method for the preservation of blood platelets, **WO/2011/124280**

Stockage et réhydratation

Indicateurs de déshydratation des Z_plt :

HR = $0.60 \pm 0.2 \%$

$a_w = 0.301 \pm 0.01$

Stockage à T° ambiante

Réhydratation

Scellage sous vide

Enceinte de stockage

Enceinte climatique

Resuspension



1 à 10 jours

- 20°C
- HR 10 à 99%
- 20 min

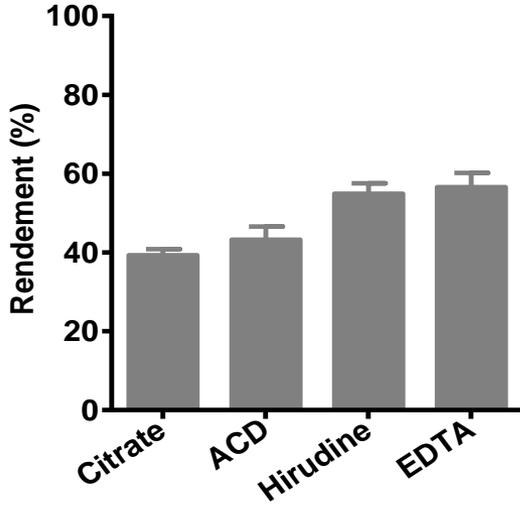
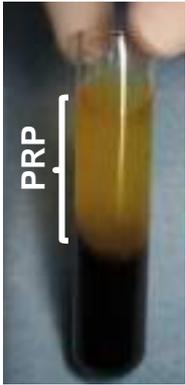
- Eau pure (bilan massique)
- Repos de 10 min
- Homogénéisation



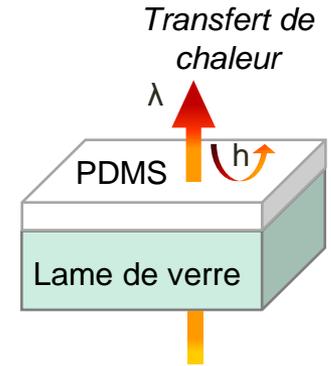
Augmentation du rendement

Matériel plaquettaire de départ

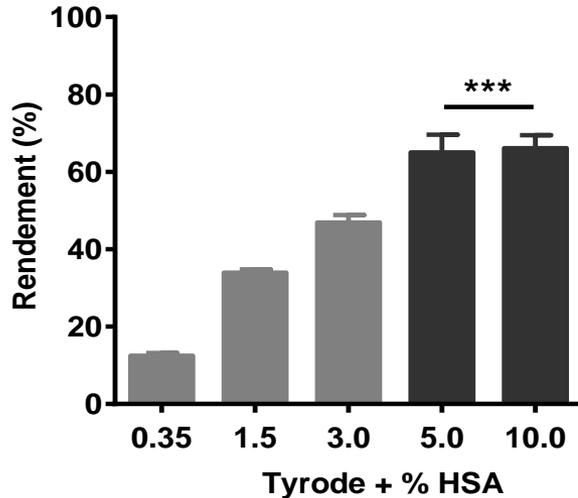
PRP



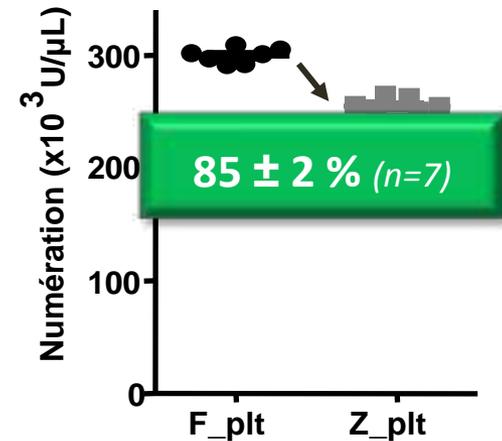
Support



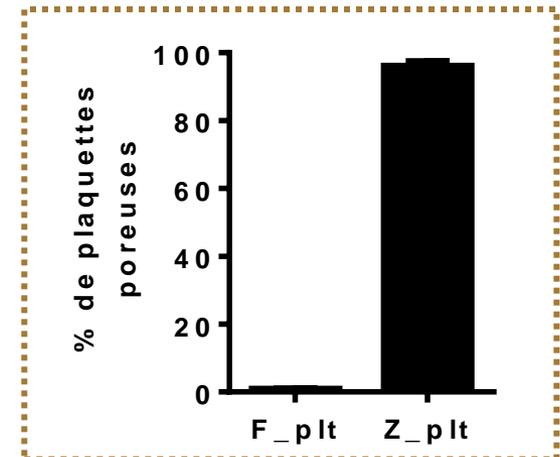
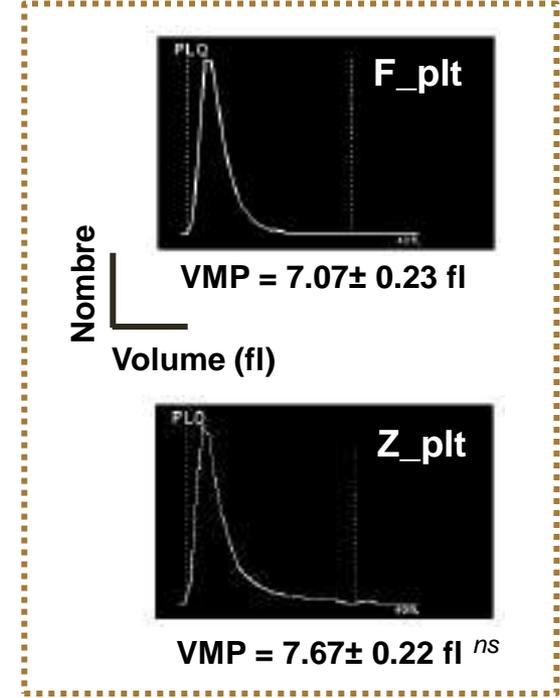
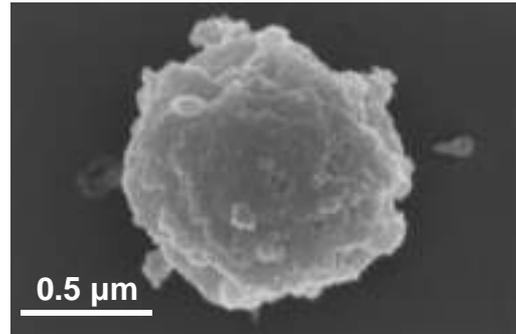
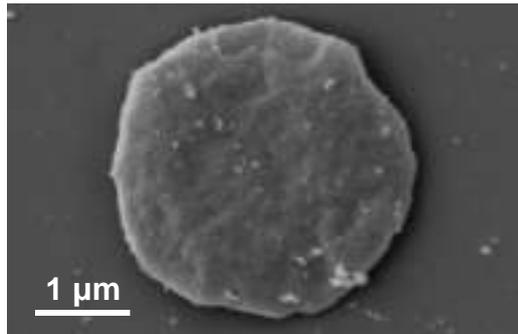
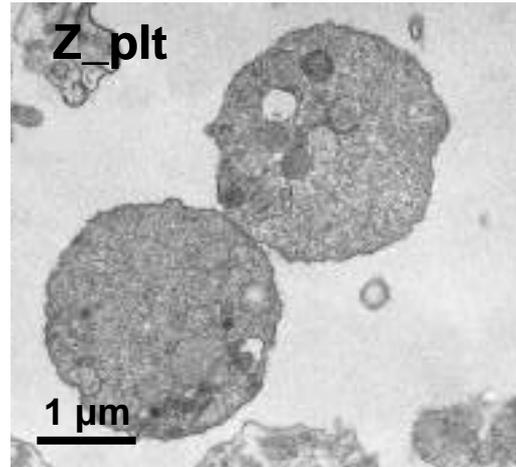
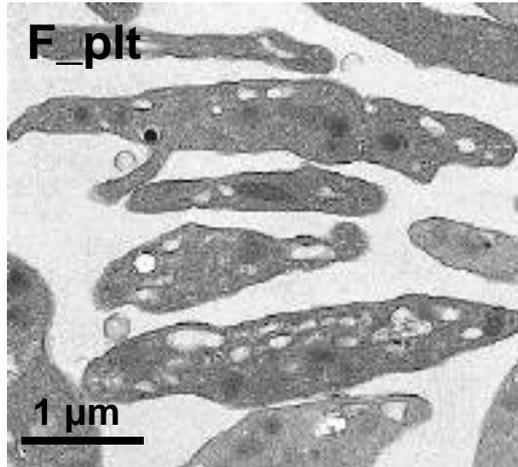
Plaquettes isolées



Rendement optimal



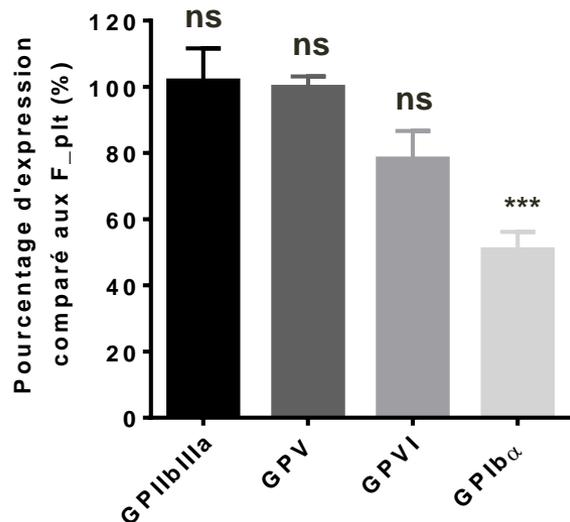
Description morphologique



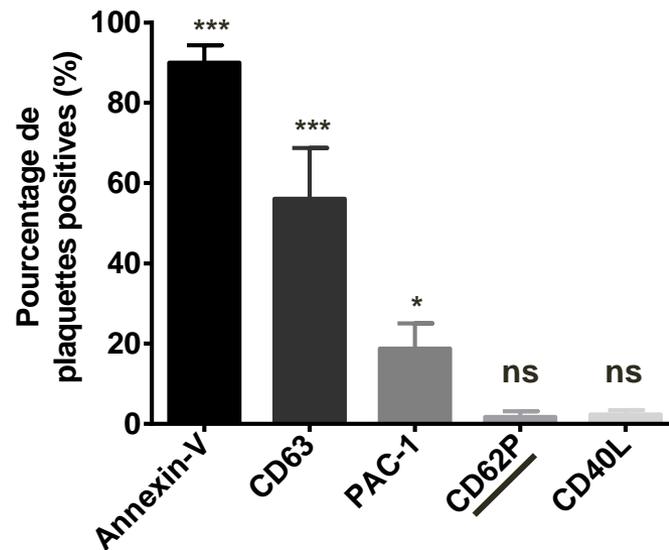
- Suspension homogène, pas d'agrégats
- Contenu granulaire partiellement conservé
- Perte de la forme discoïde
- Altération de l'intégrité membranaire

Expression et exposition des protéines plaquettaires

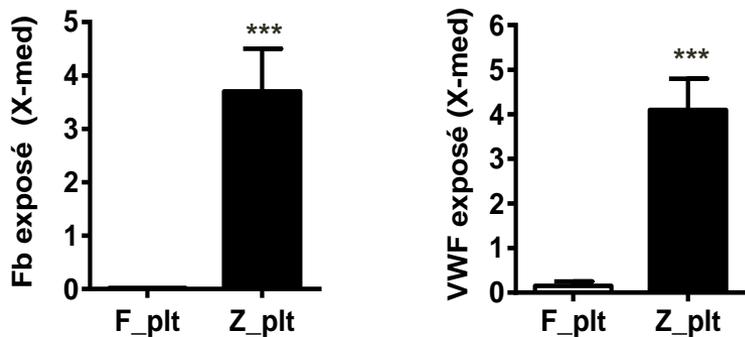
Récepteurs



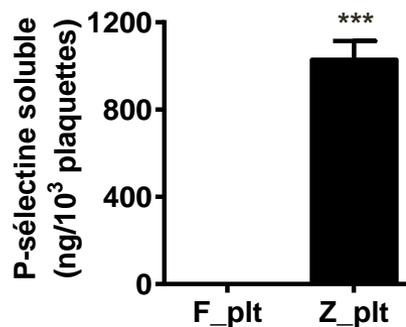
Marqueurs d'activation



Protéines adhésives



Protéine soluble

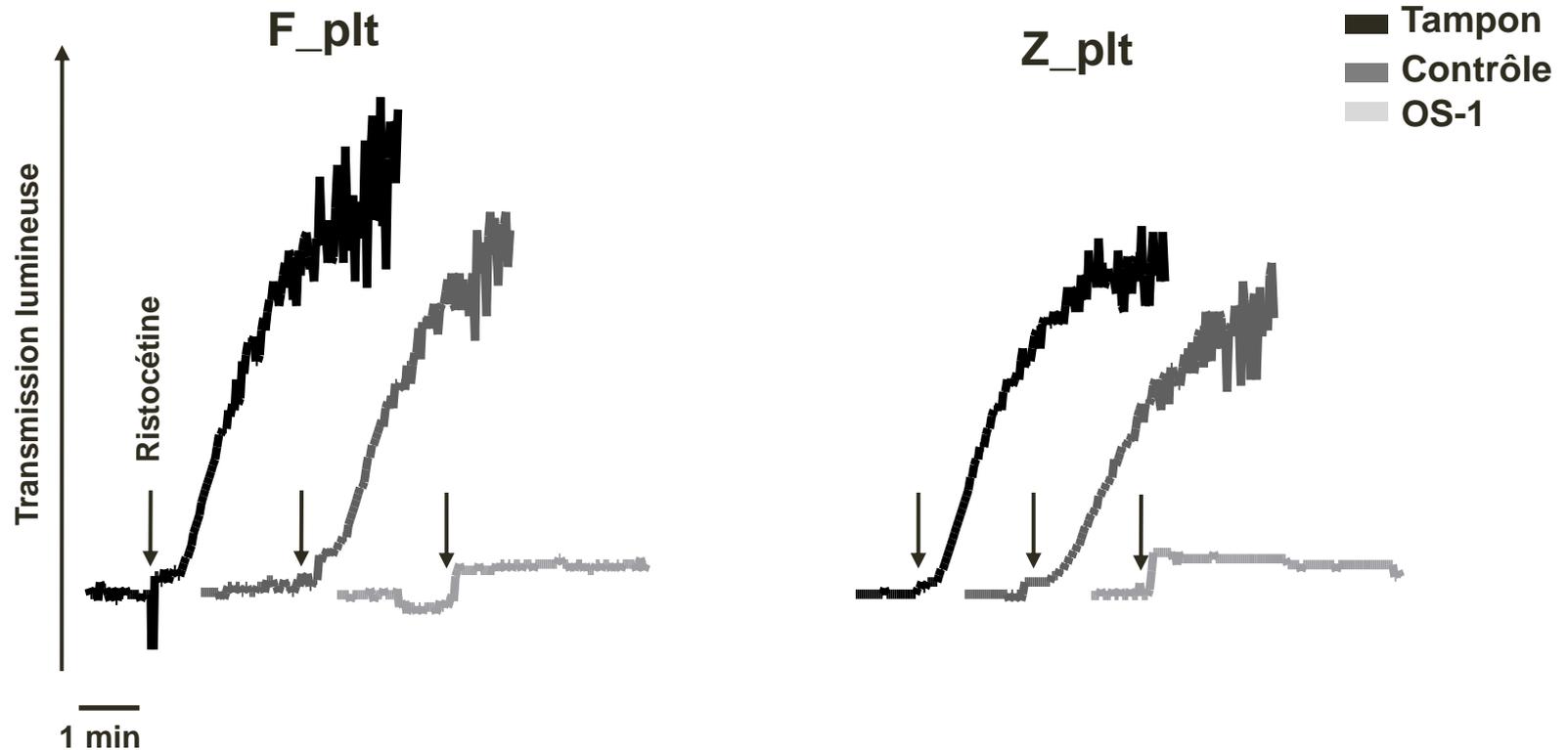


Agglutination

OS-1 : Peptide inhibiteur de Gplba, 50 nM

EDTA 5mM

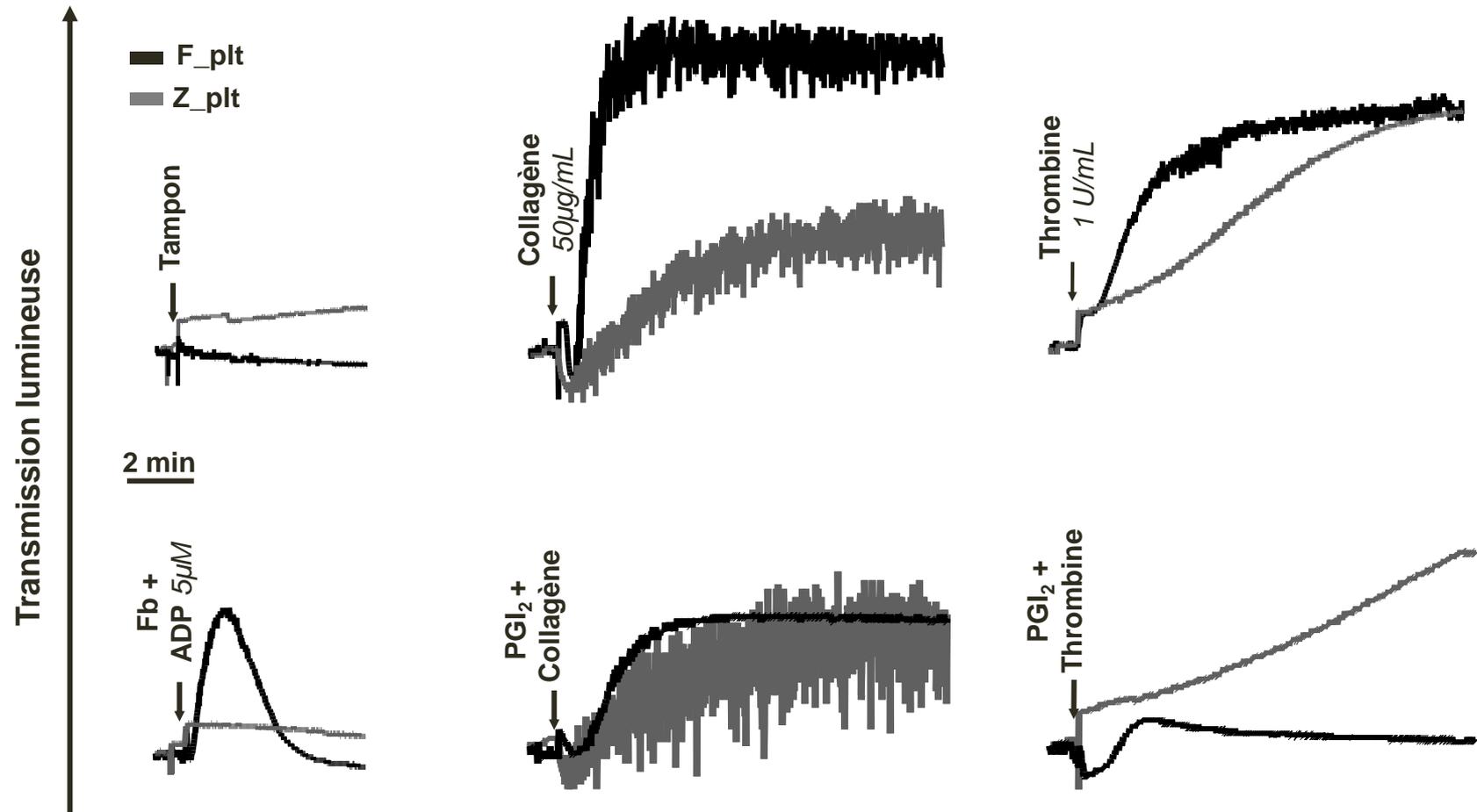
VWF Calibrator 1:10, vol/vol



**Les Z_plt sont capables de lier le VWF
contrairement aux plaquettes exposées au froid**

Agrégation

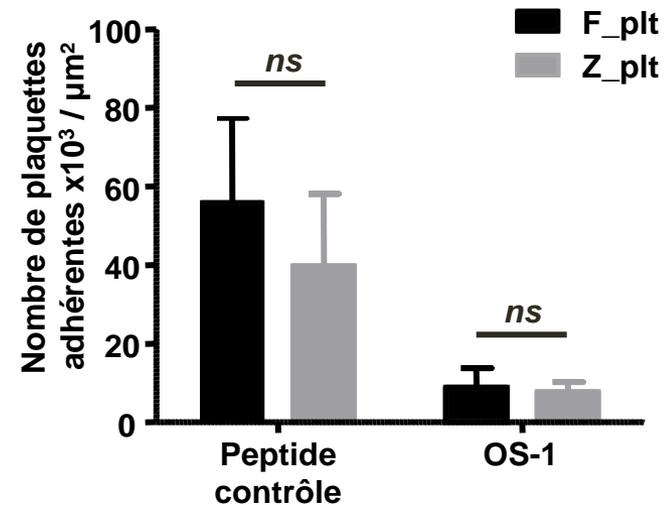
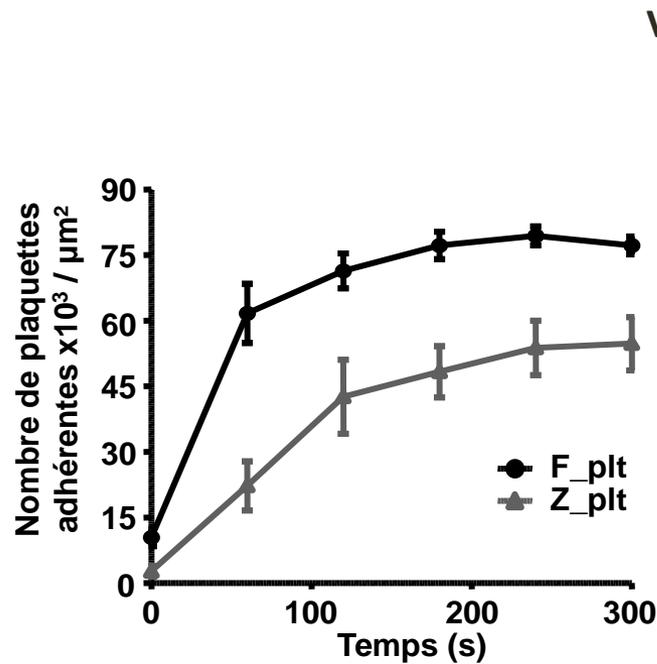
$[PGI_2] = 0,5 \mu M$



Les Z_plt forment des agrégats en condition d'agitation, indépendamment du métabolisme intracellulaire

Adhésion sur VWF

Perfusion de sang reconstitué en chambre PDMS, $n=4$



Les Z_plt adhèrent sur le VWF immobilisé spécifiquement au récepteur GPIIb α

+ VWF = 10 $\mu\text{g/ml}$
+ Fb = 200 $\mu\text{g/ml}$

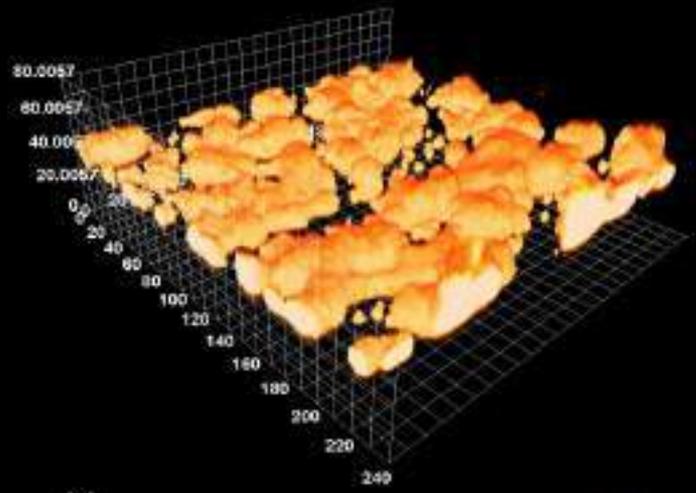
Collagène (2,5 mg/ml)

$\tau = 1000 \text{ s}^{-1}$

F_plt

Z_plt

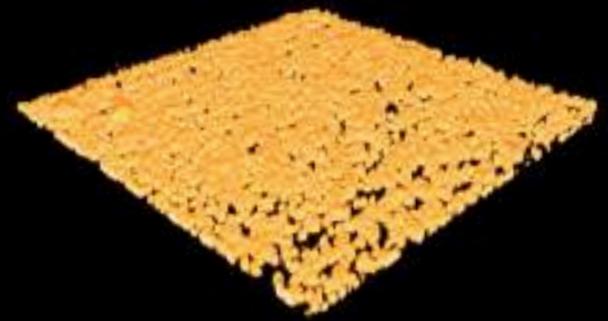
Vue 3D



Vue latérale

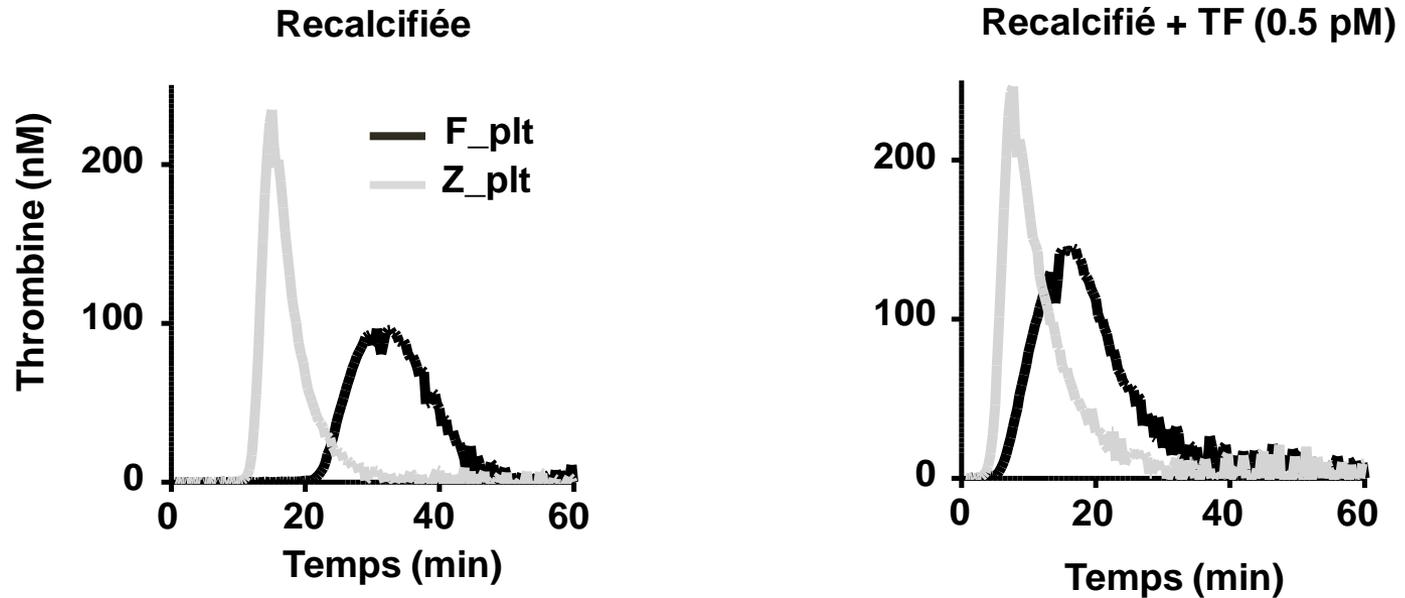


+ Reopro 40 $\mu\text{g/ml}$



Activité pro-coagulante

PRP reconstitué, n=4



Les Z_plt supportent la génération de thrombine par l'exposition intrinsèque de phosphatidylsérine

De la caractérisation *in vitro* vers la fonction *in vivo*

Méthode

- Le procédé de zéodratation est applicable à la **déshydratation** des plaquettes
- **Stockage** possible jusqu'à 10 jours

Caractérisation des Z_plt *in vitro*

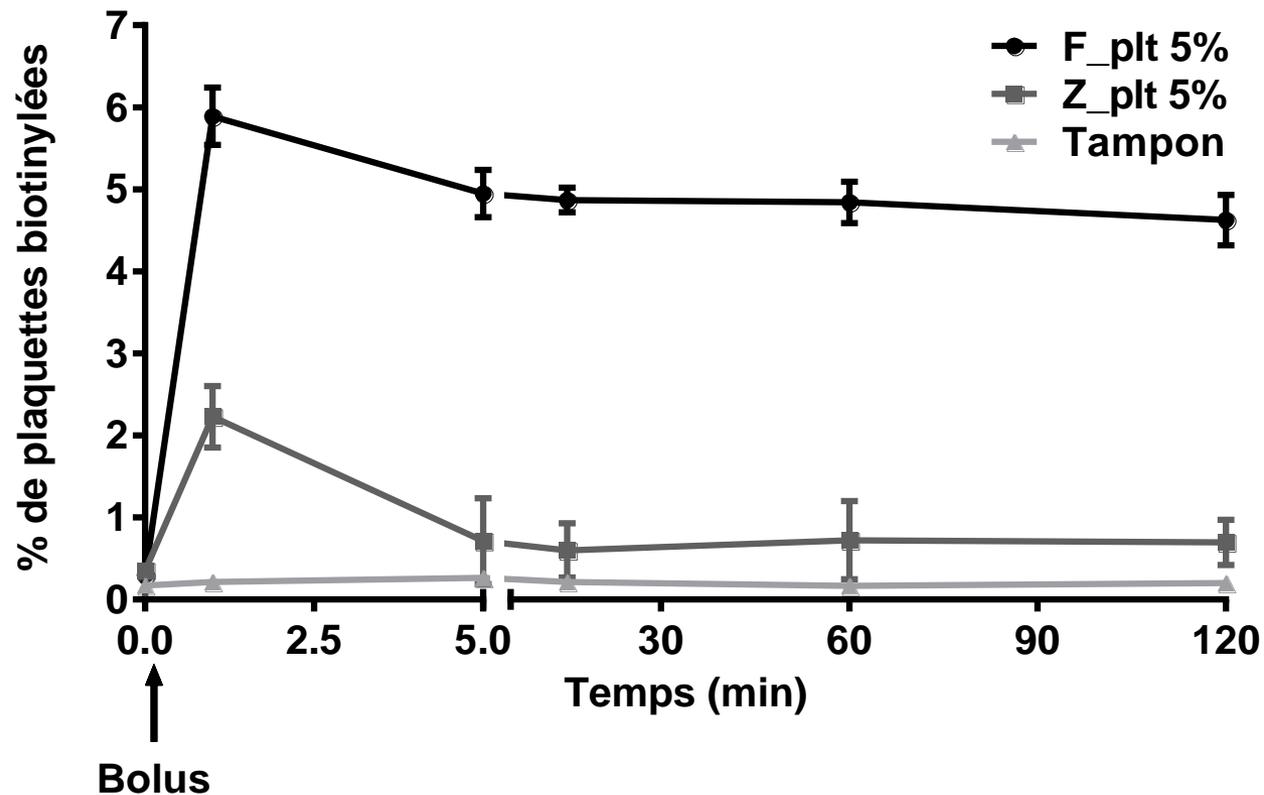
- **Rendement** moyen supérieur au procédé de lyophilisation
- Modification de la **morphologie**
- Capacité de formation d'**agrégats** et de **thrombus *in vitro***
- Support de l'**activité pro-coagulante**

Efficacité hémostatique ?

Une étude similaire a été menée sur les plaquettes de souris (C57BL/6 WT) :
résultats identiques

Transfusion par bolus

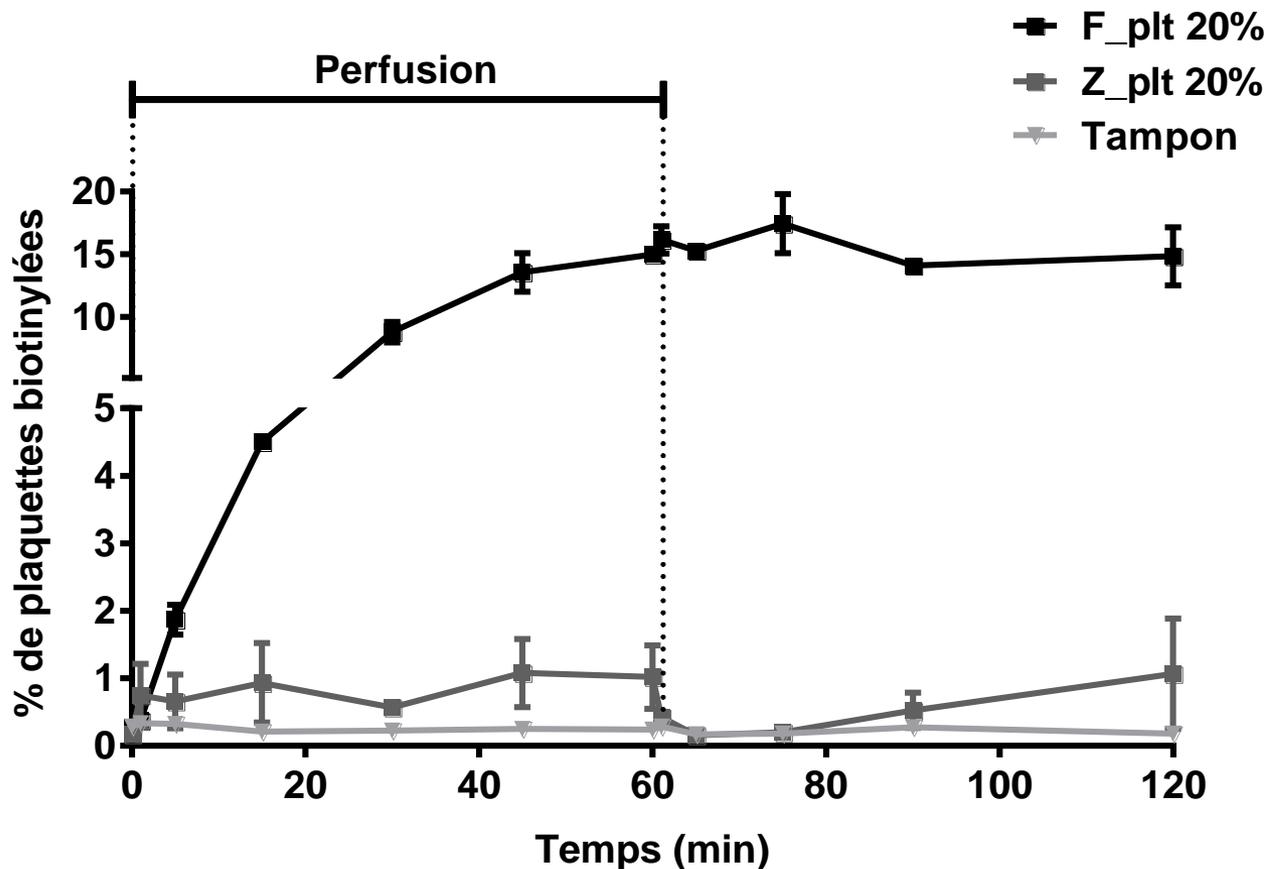
Voie: retro-orbitale, $V_{max} = 100 \mu L$, $n=8$



Les Z_plt sont rapidement éliminées de la circulation sanguine

Transfusion par perfusion

Voie: veine jugulaire, $300\mu\text{L}/\text{h}$, $V_{\text{max}} = 300\mu\text{L}$, $n=8$



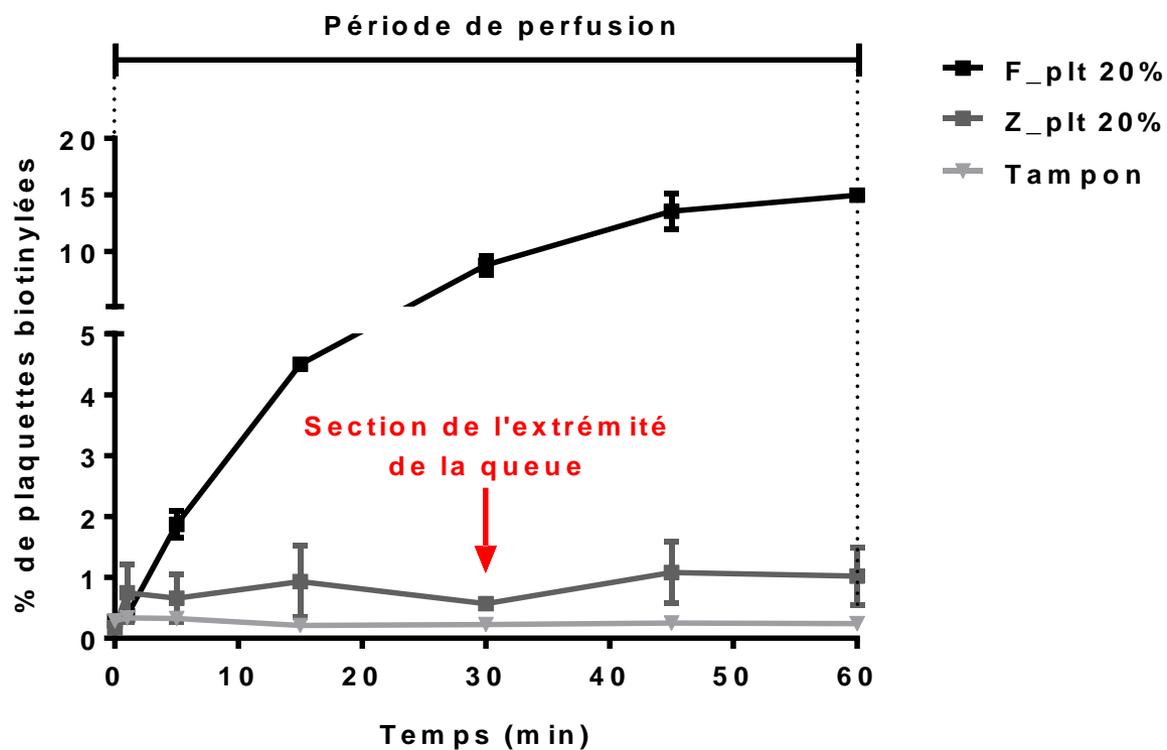
La perfusion permet un apport continu de Z_plt et la transfusion d'une masse plaquettaire plus importante

Modèle animal et méthode expérimentale



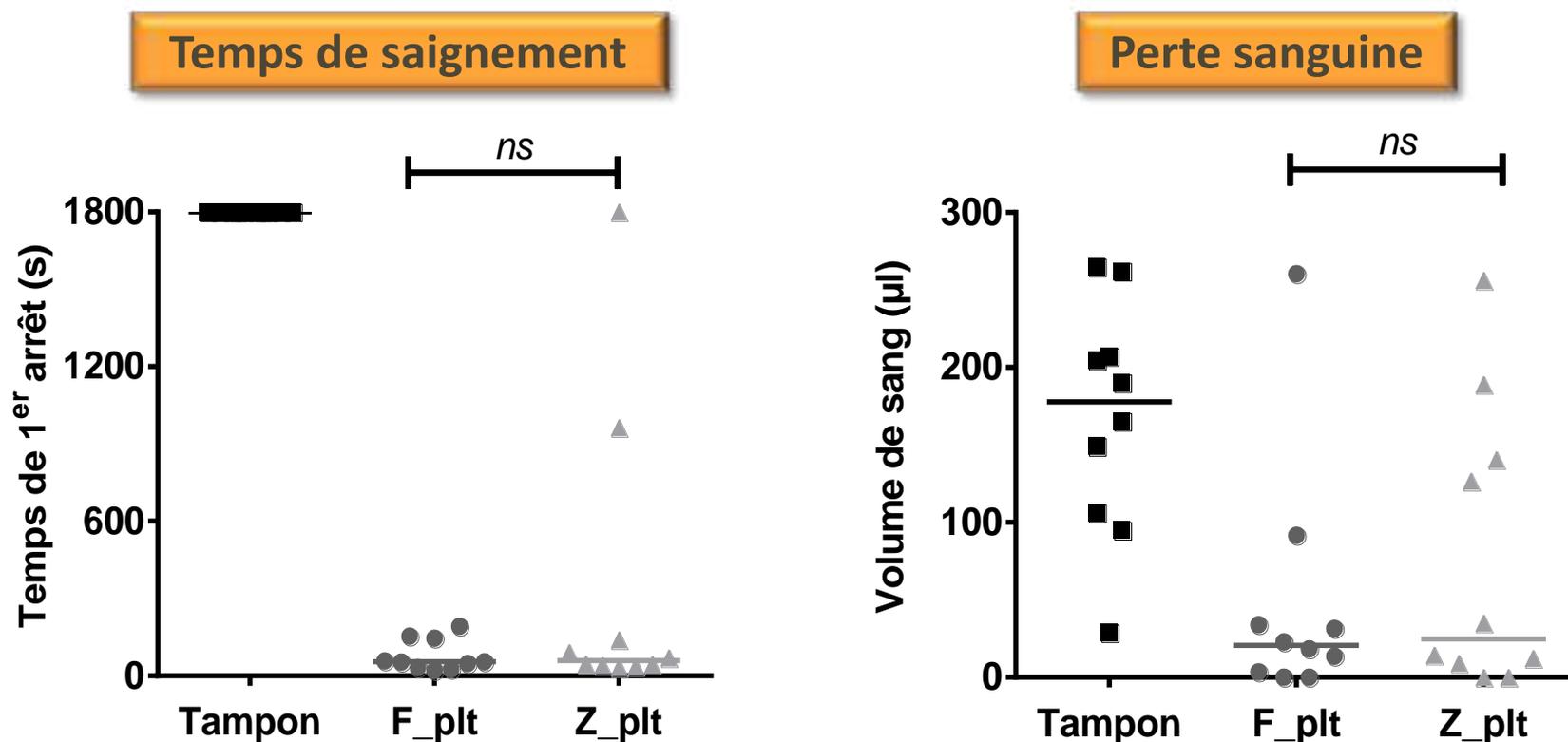
Clopidogrel 10 mg/kg 24 h et
4 h avant transfusion

WT-C57BL/6, mâle, 8-10 semaines



Efficacité hémostatique

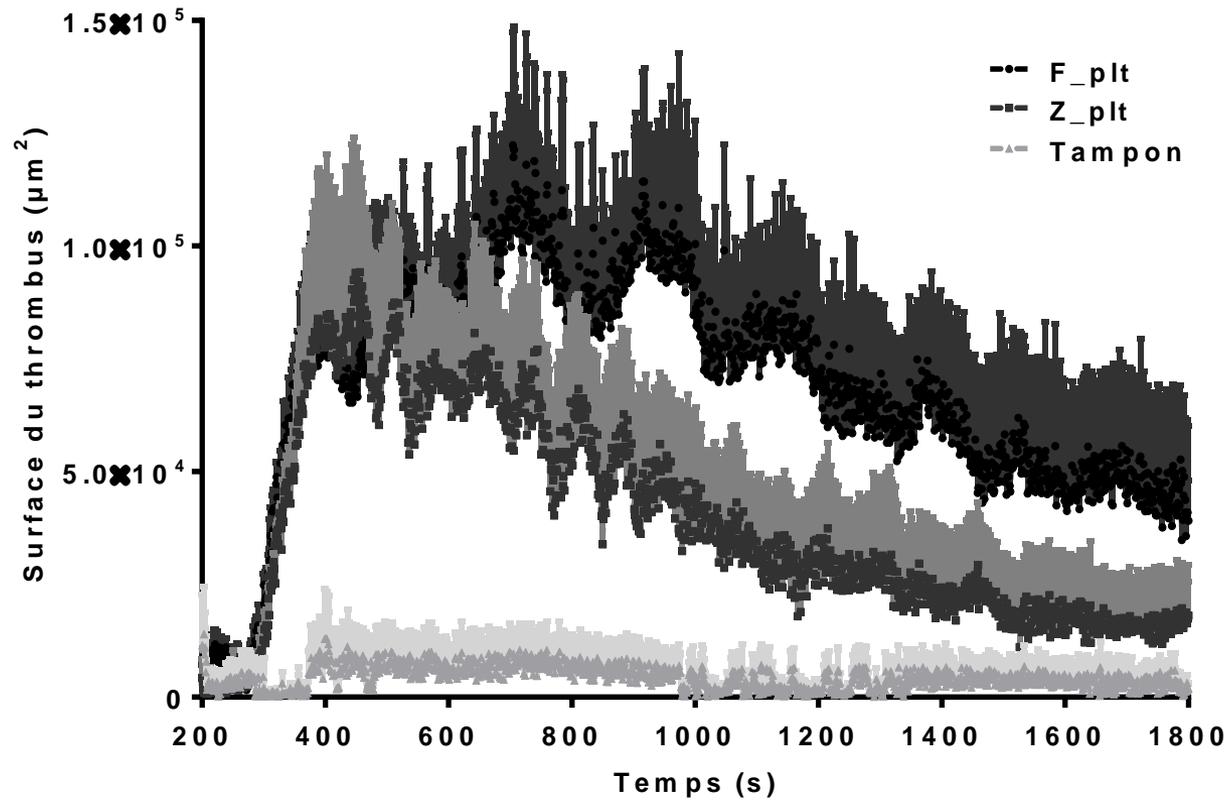
Mesure jusqu'à 30 min, n=10



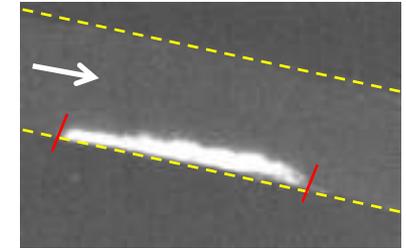
La transfusion de Z_plt permet de corriger le temps de saignement et la perte sanguine de souris dont la fonction hémostatique est inhibée

Formation d'un thrombus

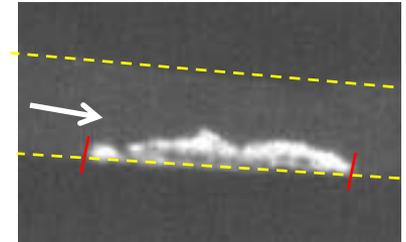
Modèle de lésion induit par $FeCl_3$, artère carotide commune, $n=4$



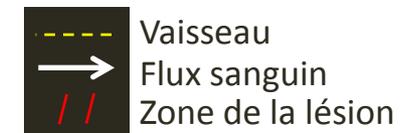
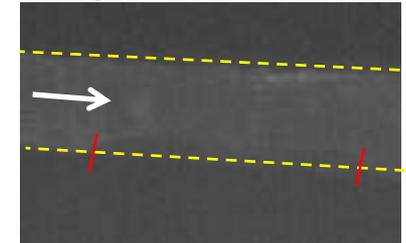
F_plt



Z_plt



Tampon



Les Z_plt forment un thrombus au site d'une lésion vasculaire

Conclusions

- La méthode de zéodratation est **applicable** aux plaquettes sanguines pour leur stockage à la long terme
- **Aspect économique** favorable au procédé de zéodratation
- Les Z_plt sont capables d'assurer certaines **fonctions hémostatiques** *in vitro et in vivo* malgré une **morphologie** altérée

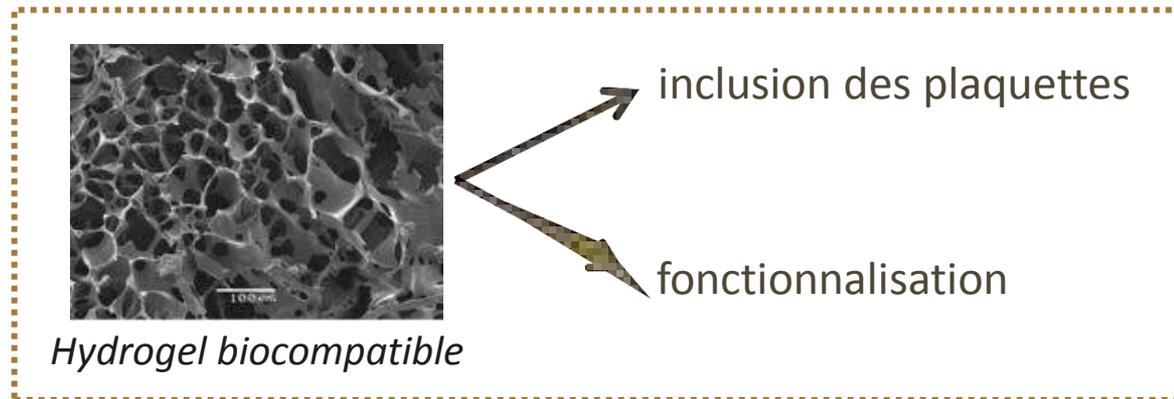
Les Z_plt sont-elles applicables à la transfusion ?

- Critères transfusionnels :
 - **innocuité** et **sécurité** : facteurs pro-inflammatoire et pro-thrombotique
 - **efficacité** hémostatique et temps de recirculation

Perspectives

- La zéodratation à température ambiante entraîne des modifications du **milieu extracellulaire** au cours du procédé (pH, osmolarité)
- La piste d'amélioration principale concerne la mise au point d'un **milieu de déshydratation** spécifique

=> projet en cours de développement en collaboration avec l'U698 (D. Letourneur)



- Le **diagnostic** le **contrôle qualité** sont d'autres champs d'applications des Z_plt à court terme

Remerciements

UMR_S956

La Pitié-Salpêtrière

Francine RENDU

Dr Stéphane HATEM

APHP

Lariboisière

Pr Ludovic DROUET

Dr Bernadette BOVAL

Equipe technique

UMR_S949

EFS Alsace

Dr Christian GACHET

Pr Jean-Pierre CAZENAVE

Anita MICHEL

Monique FREUND

Catherine RAVANAT

Pierre MANGIN

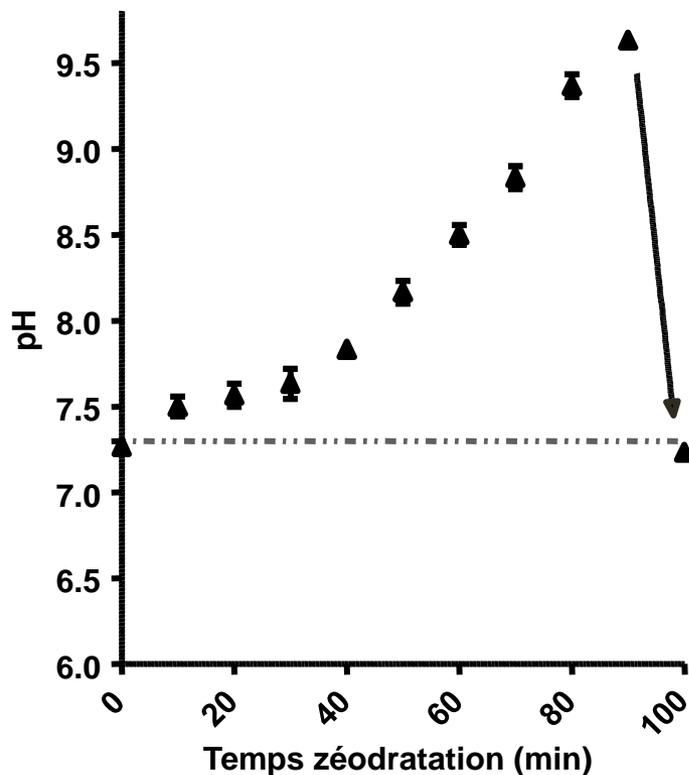
Dominique CASSEL

Equipe Technique & doctorants



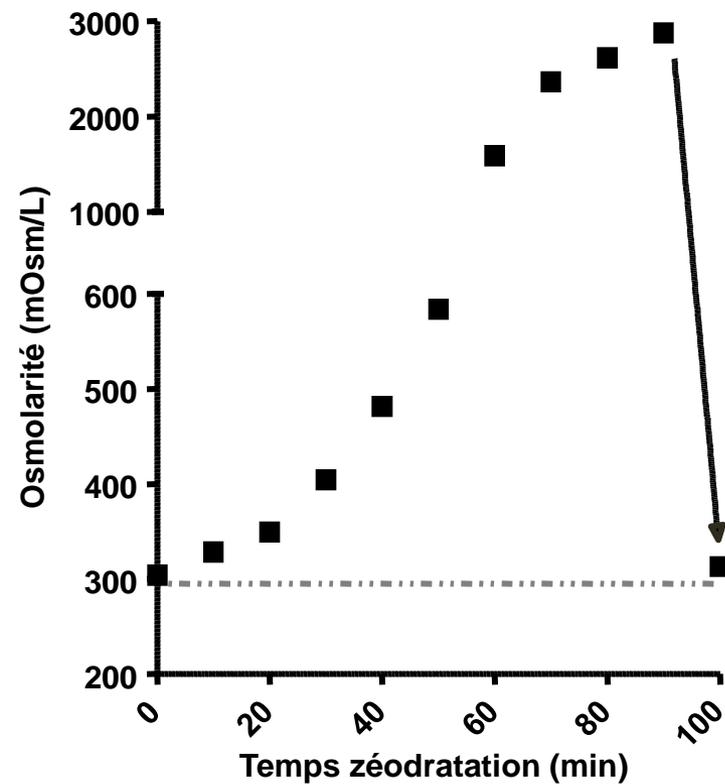
Evolution du milieu au cours de la zéodratation

pH



→ post réhydratation

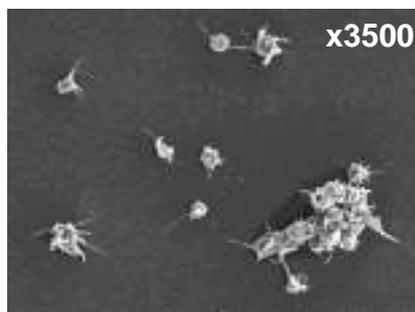
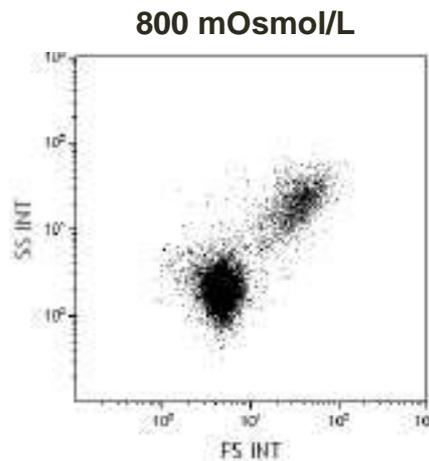
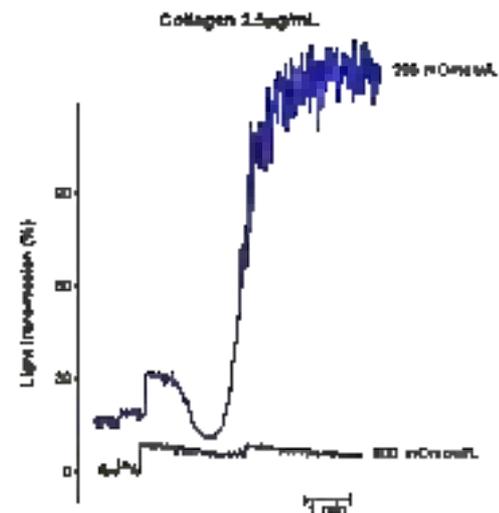
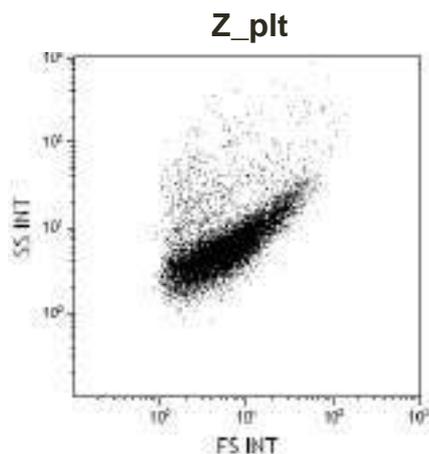
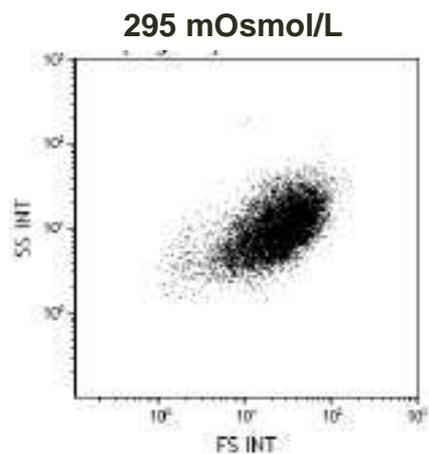
Osmolarité



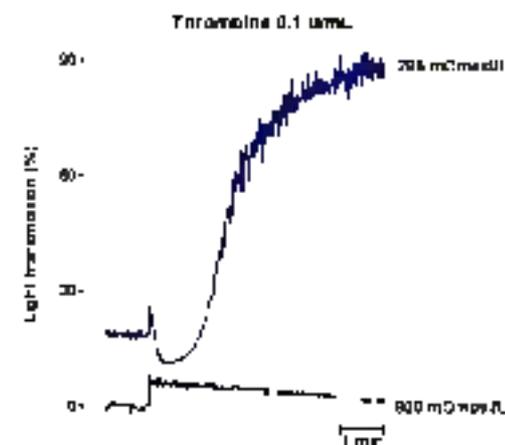
→ post réhydratation

Effet de l'hyperosmolarité sur les plaquettes sanguines

Plaquettes humaines isolées + faible volume (< 10%) NaCl 1M ou 2.5M, incubation $t_{z\acute{e}odration}$

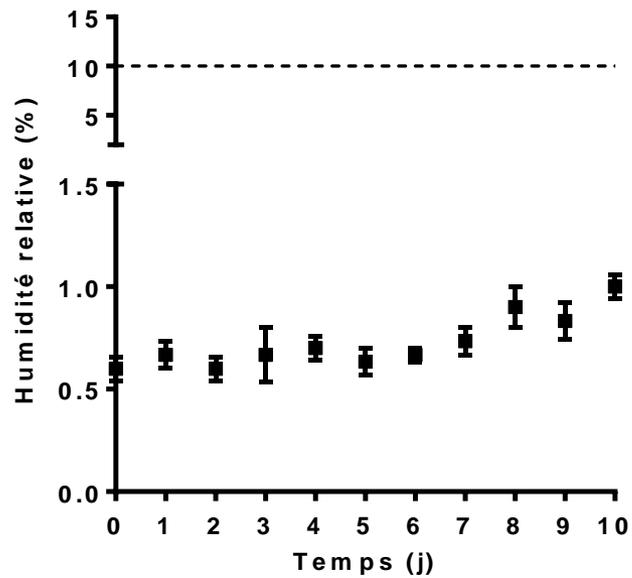


800 mOsm/L

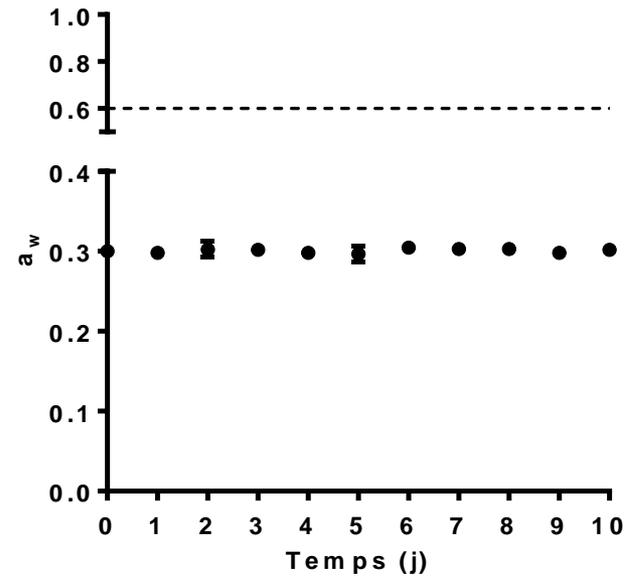


Stabilité des Z_plt

HR (%)

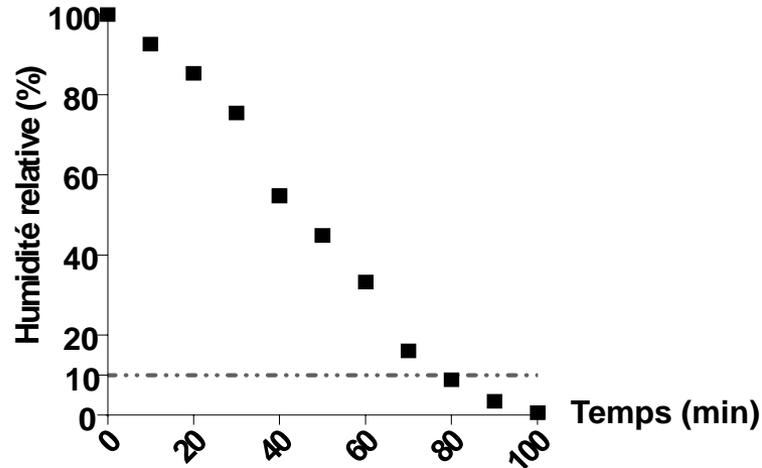


a_w

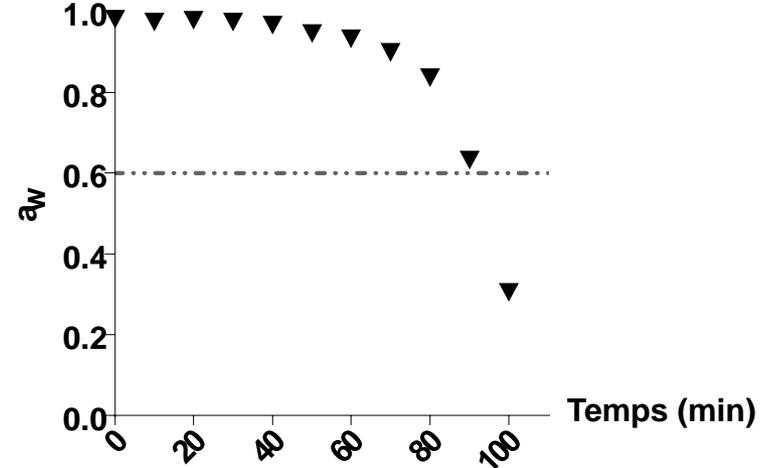


Paramètres propres de zéodratation

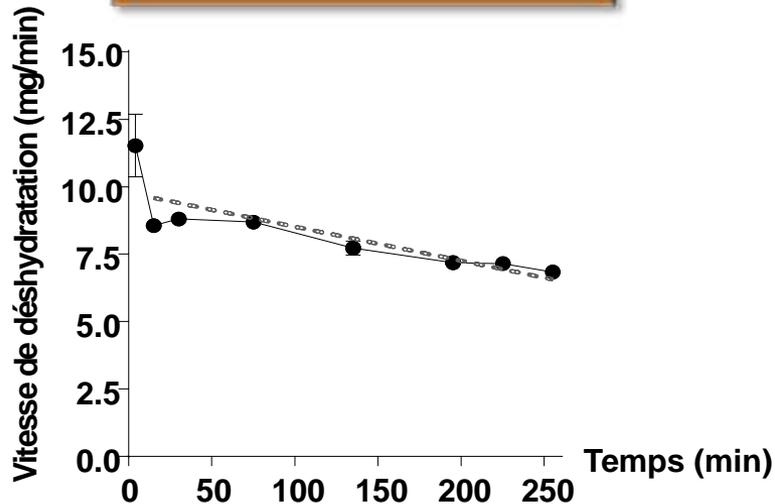
Temps de zéodratation : HR (%)



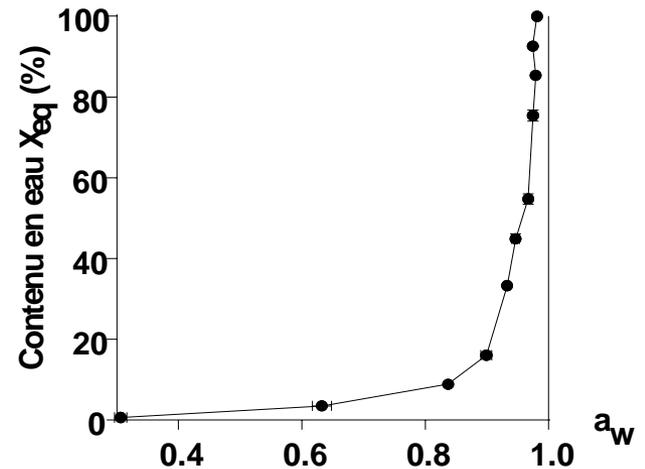
Temps de zéodratation: a_w



Vitesse de zéodratation

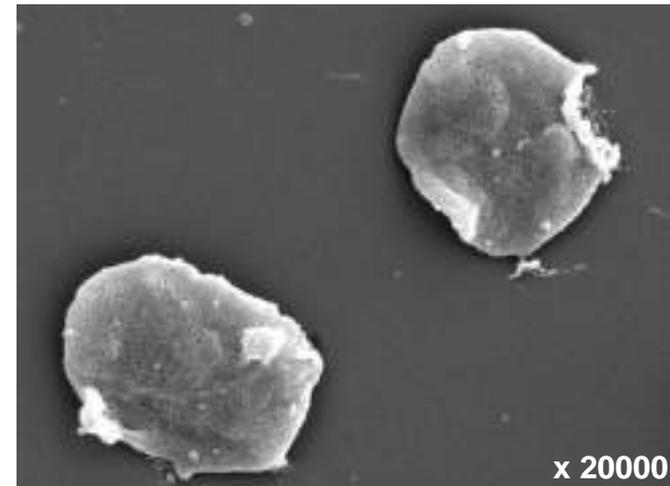
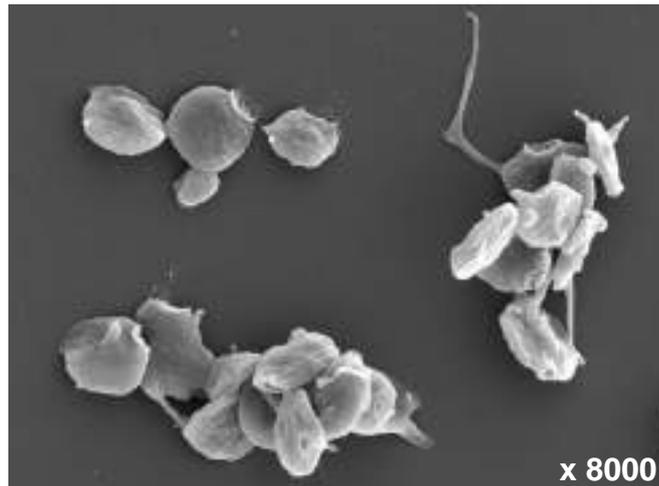
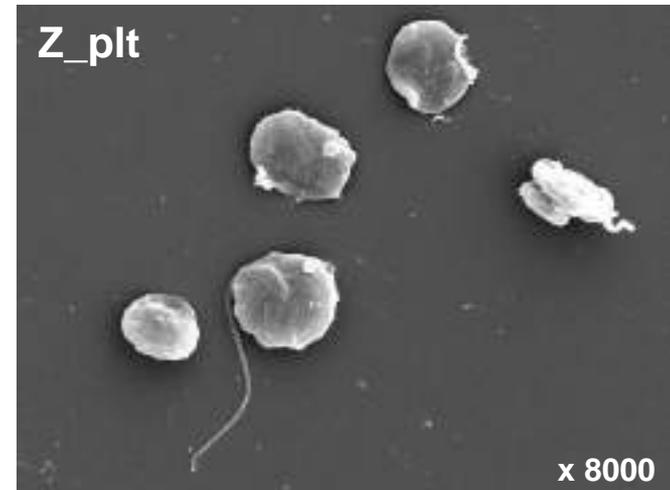
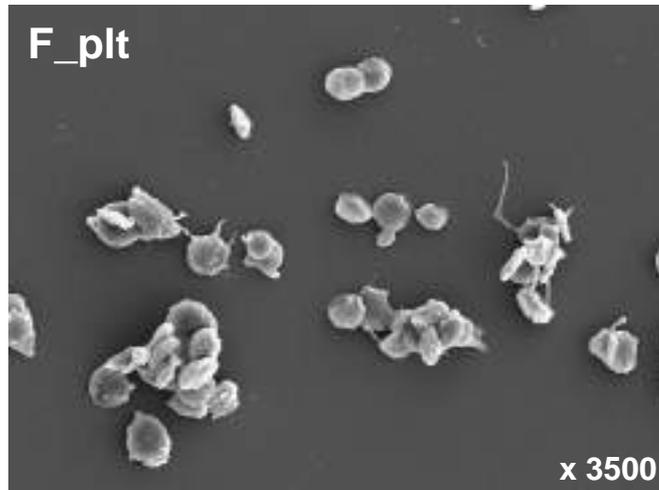


Isotherme de désorption



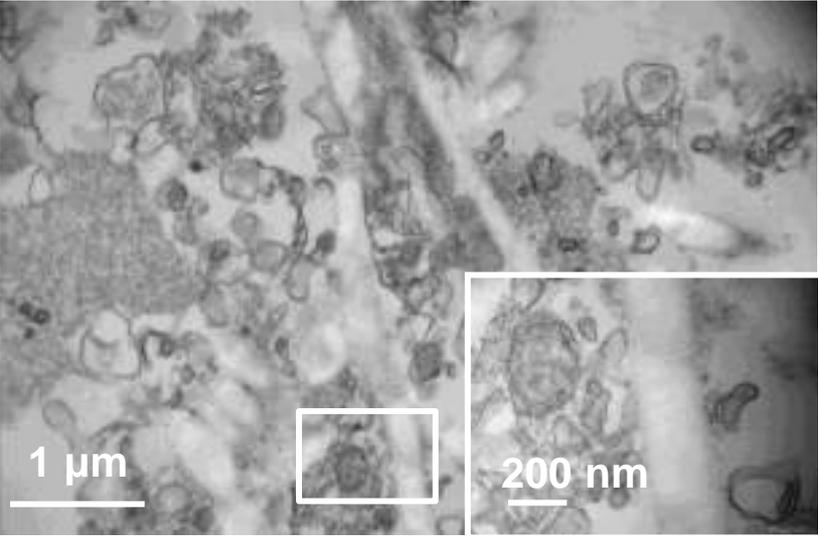
Zéodratation des plaquettes fixées

Fixation PFA 1,8 %, 1h, 20°C, 3 lavages

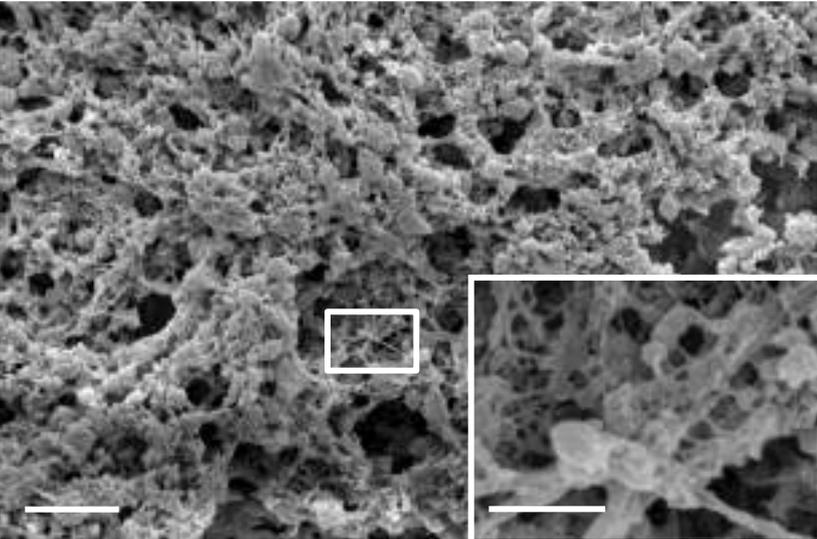
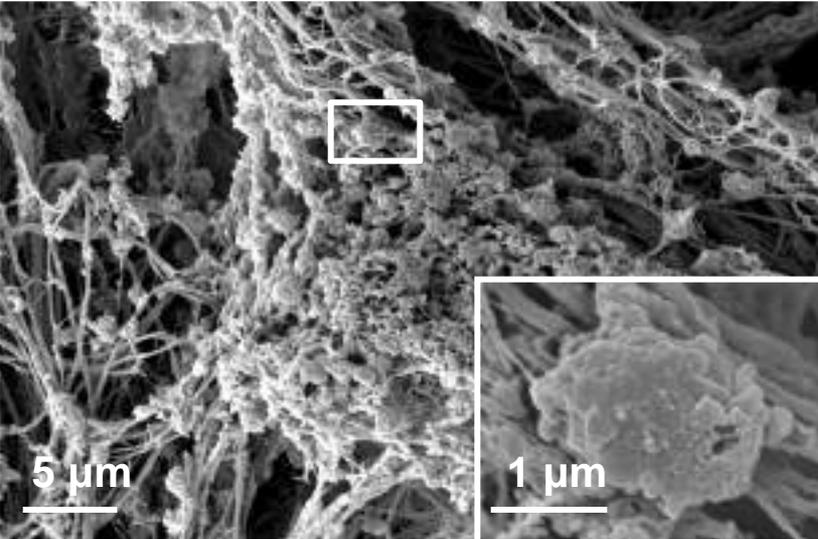
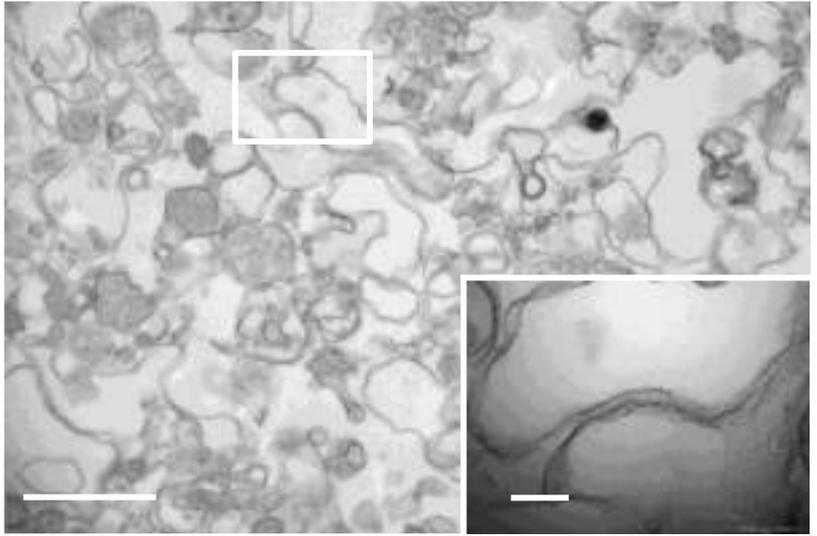


Observation des agrégats

Collagène 50 µg/ml



Thrombine 1 U/ml

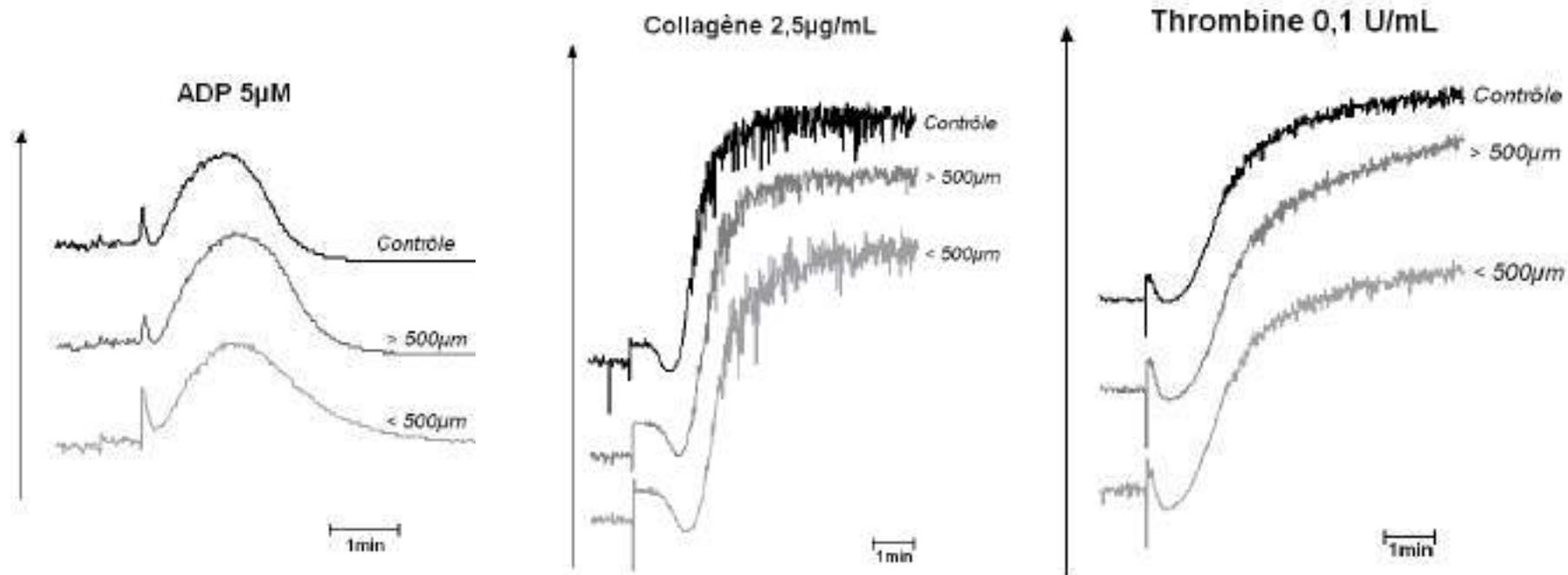


Zéodrateur à l'échelle pilote



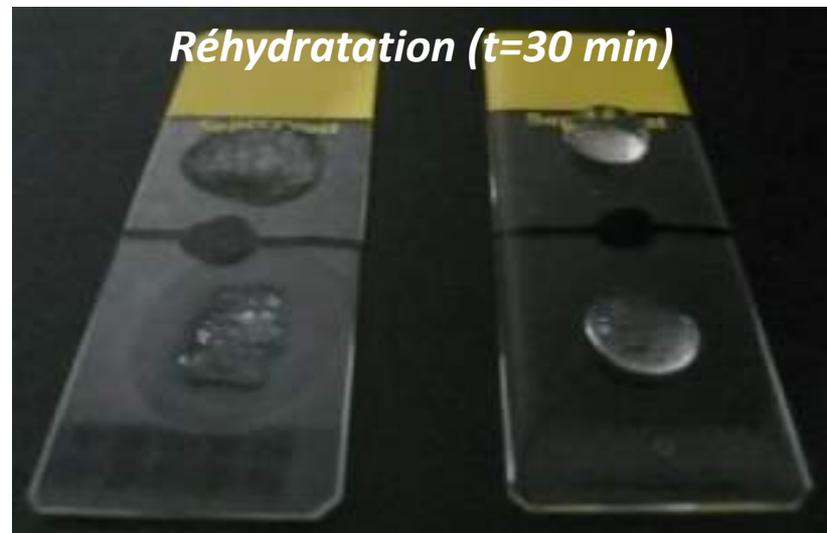
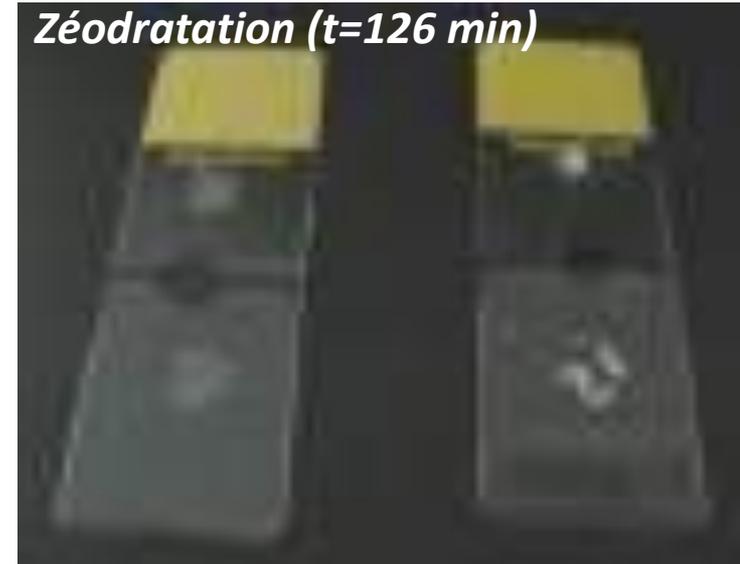
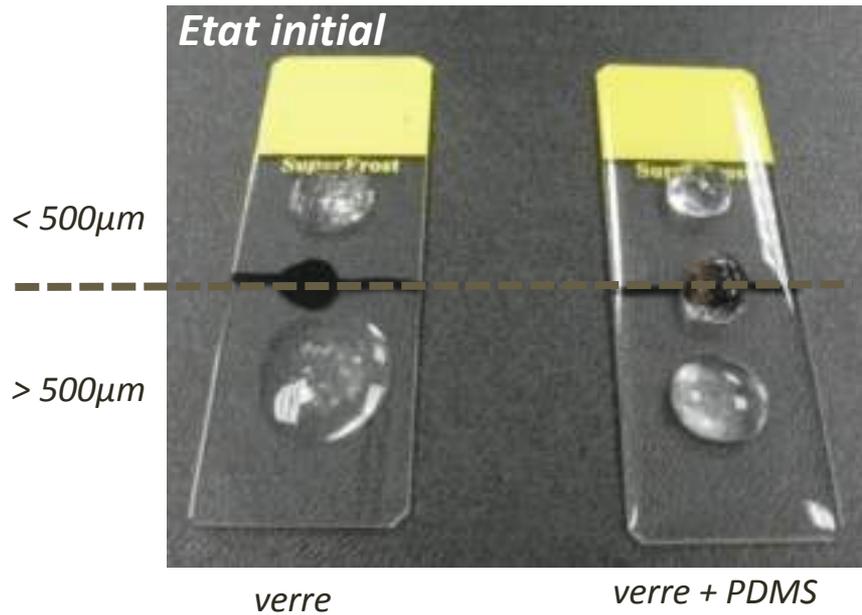
Effet des hydrogels sur l'agrégation plaquettaire

[hydrogel] = 20mg/mL, plaquettes isolées 300.10^3 U/ μ L, incubation 60min, 37°C

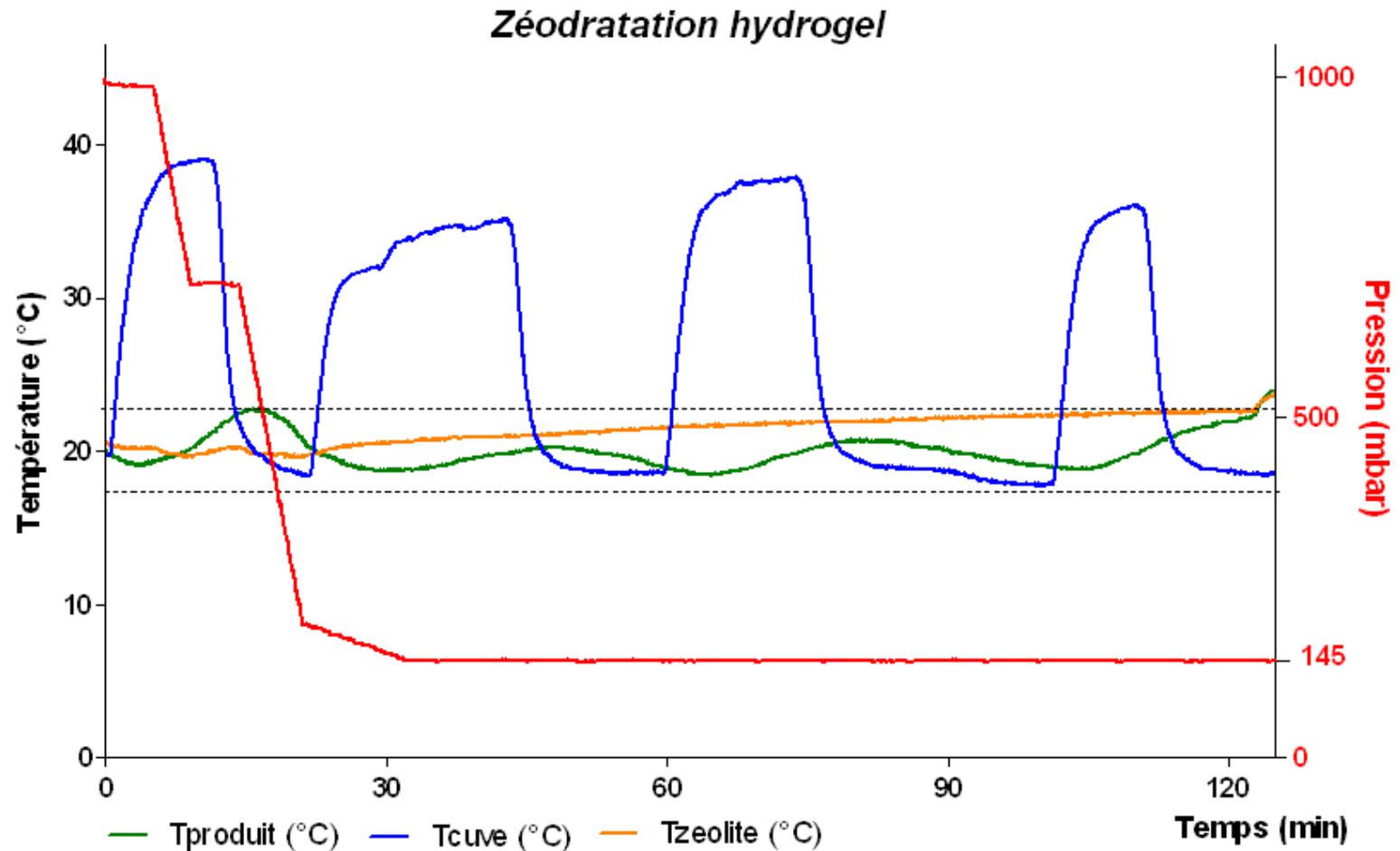


Rendement de 90% mais nécessite une étape de reconcentration

Zéodratation des hydrogels



Zéodratation des hydrogels



HR = 1,21% ; a_w = 0,412 ; t=129min

Preservation of hemostatic and structural properties of rehydrated lyophilized platelets: Potential for long-term storage of dried platelets for transfusion

(platelet adhesion/platelet aggregation/thrombocytopenia/thrombosis)

MAJORIE S. READ*†‡, ROBERT L. REDDICK*†, ARTHUR P. BOOE†§, DWIGHT A. BELLINGER*†,
 TIMOTHY C. NICHOLS*†§, KATHERYN TAYLOR*, SCOTT V. SMITH*, DEBRA K. McMAHON*,
 THOMAS R. GRIFFS*†§, AND KENNETH M. BRINKHOLZ*†

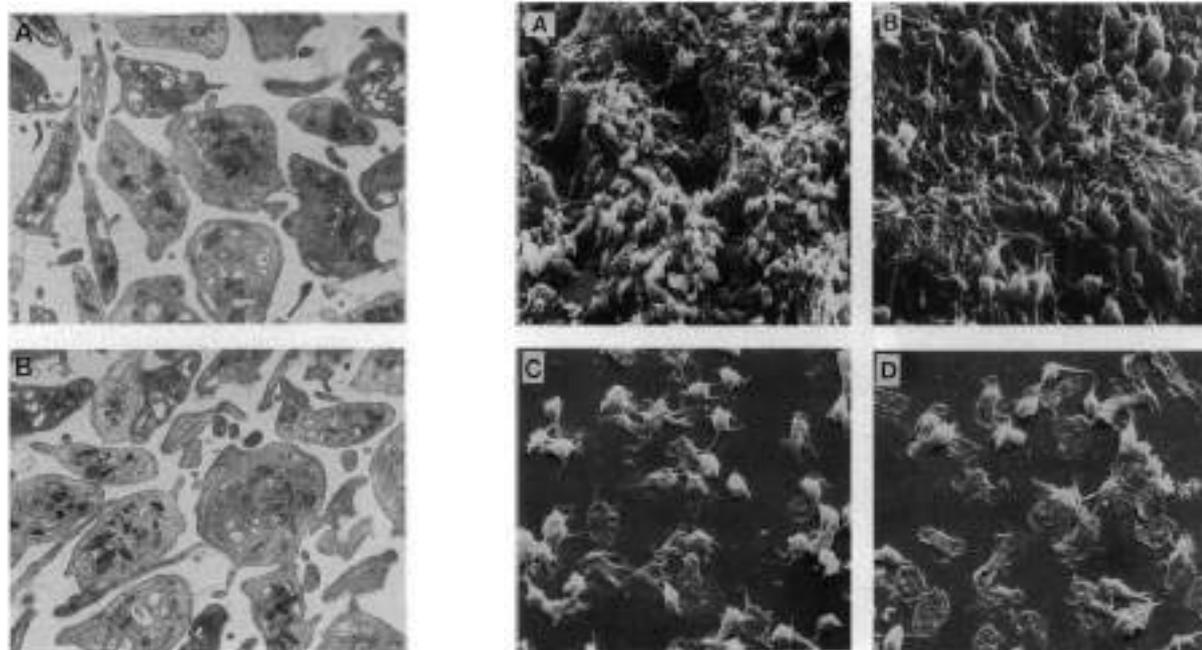


Table 2. Infusions of human RL platelets shorten the prolonged BTs in thrombocytopenic rats

Animal	Normal		Thrombocytopenic		Thrombocytopenic with RL platelets	
	BT, min	Platelet count per μl , $\times 10^{-3}$	BT, min	Platelet count per μl , $\times 10^{-3}$	BT, min	Platelet count per μl , $\times 10^{-3}$
1	0.5	685	>15	25	0.5	220
2	2.0	580	>15	32.5	1.5	237



Optimization study on the rehydration process of lyophilized human platelets

FAN JuLi^{1,2}, XU XianGuo^{3,4}, ZHANG ShaoZhi^{2*}, XU MengJie², ZHU FaMing^{3,4} & CHEN GuangMing²

Article

Chinese Science Bulletin

Engineering Thermophysics

February 2011 Vol.56 No.4-5: 455-460

doi: 10.1007/s11434-011-4381-7

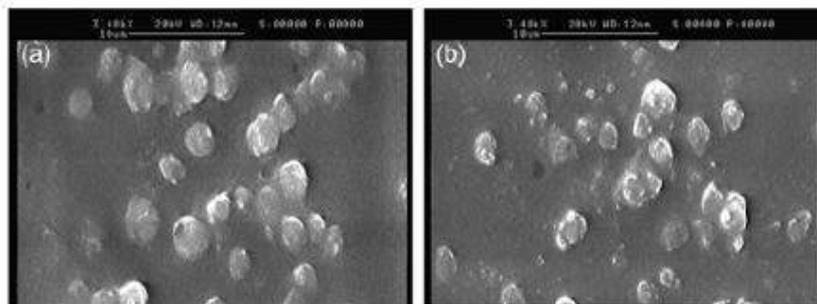


Figure 5 SEM pictures of rehydrated platelets. (a) Optimized rehydrated platelets (3480 \times); (b) directly rehydrated platelets (3480 \times).

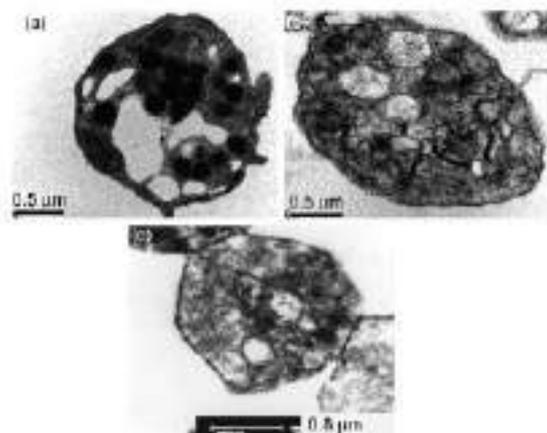


Figure 6 TEM pictures of fresh and rehydrated platelets. (a) Fresh platelets (30000 \times); (b) directly rehydrated platelets (30000 \times); (c) optimized rehydrated platelets (20000 \times).

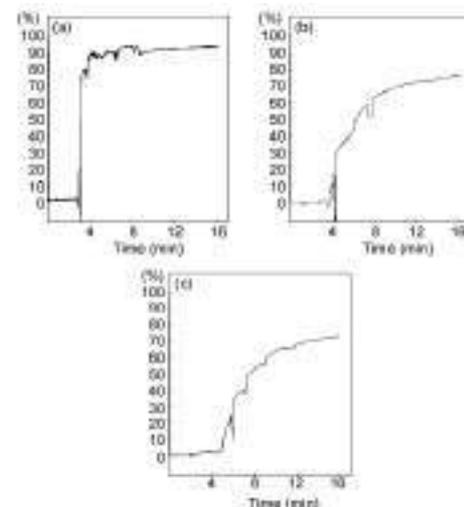


Figure 7 The aggregation traces of platelets. (a) Control (fresh platelets); (b) optimized rehydrated platelets; (c) directly rehydrated platelets.

Table 1 Platelets recovery rehydrated with 50% plasma ($n = 4$)

Prehydration duration (min)	Platelets recovery (%)	
	1 mL	2 mL
0	80 \pm 7.4	69 \pm 5.2
15	89 \pm 9.4 ^(a)	70 \pm 4.7
30	86 \pm 8.4	72 \pm 3.3
60	79 \pm 6.9 ^(b)	63 \pm 4.6 ^(b)
90	78 \pm 7.0	85 \pm 7.5 ^(a,c)
120	77 \pm 5.3	80 \pm 3.4 ^(c)

a) $P=0.03<0.05$, b) $P=0.01<0.05$, c) $P=0.29>0.05$.