

Summary

Thrombodinamography is the most satisfactory technique for controlling the biological effects of transfusions of human platelets. It permits evaluation of these transfusions on thromboplastic activity and particularly on the thrombodynamic value of the clot during coagulation.

The thromboplastic function of platelets, which may be estimated through the longitudinal constants of thrombodinamograms, is linked to a factor originating from the platelet granules and which only becomes active after lysis of the platelets themselves.

The thrombodynamic function of platelets, which is estimated from the transverse constants of thrombodinamograms, is exerted by living figured platelet elements which are functionally active. Only this property characterizes the haemostatic value of platelets.

The haemostatic activity of platelet transfusions must be estimated from correction of the transverse constants of the diagrams. With regard to this, platelet suspensions preserved by freezing or lyophilization and perfusions of platelet lysates have practically no haemostatic effect. Only suspensions of fresh platelets appear to have a useful haemostatic activity. The activity of these suspensions varies according to the patient and to the product perfused. They maintain this activity for 4 to 7 days (if this period is intended as the survival of the vital functions of transfused platelets in the receivers), often presenting a maximum the day following transfusion. It is often possible to observe temporary and paradoxical deterioration of the thrombopenia and of its consequences, immediately following transfusion. In such cases, thrombodinamography strongly suggests the probability of temporary sequestration of the infused platelets.

260

Concentrés plaquettaires et plaquettes lyophilisées

Etude *in vitro* et *in vivo*

L. REVOL, C. P. BRIZARD, G. DENHAUT, J. P. THOUVEREZ,
M. MORATI ET M. SALVY

Lyon, France

Depuis de nombreuses années et plus particulièrement depuis 1951 (*Dillard, Brecher et Cronkite*), la préparation de concentrés plaquettaires actifs et d'utilisation pratique facile préoccupent les spécialistes de transfusion.

Si l'on est arrivé assez rapidement à des méthodes de prélèvement (sur séquestréne ou complexon en récipient siliconé) et de séparation (sédimentation accélérée ou paradoxale ou centrifugation différentielle) donnant satisfaction quant aux résultats immédiats (*Van Creveld, Paulssen et Bartels, Minor et Burnett, André, Tullis, Stefanini, Maupin*, etc.), si nous-mêmes pouvions faire état au Congrès de Bordeaux en 1956 de 8 malades traités par des concentrés plaquettaires frais, parfois avec succès, il faut reconnaître que la méthode pouvait difficilement entrer dans la pra-

tique courante du fait de ses difficultés d'application: nécessité de 10 à 20 donneurs, d'un groupe donné, obligation de réaliser toutes les opérations en quelques heures pour injecter les plaquettes le jour même, handicap de ces quelques heures perdues pour des malades dont le traitement aurait dû être appliqué d'urgence. On conçoit alors l'intérêt des méthodes permettant de *conserver les plaquettes* et par conséquent de les préparer tranquillement, lorsqu'on a pu réunir les donneurs nécessaires, et de les stocker pour une utilisation immédiate en cas d'urgence.

Jones, Tullis proposèrent pour cette conservation des milieux à base de gélatine, permettant certainement le maintien relatif de leurs propriétés et de leur activité (*Maupin*), mais exigeant des manipulations délicates, et en particulier 3 lavages, au moment de l'utilisation.

La *lyophilisation* permettait de résoudre de façon commode le problème des transfusions plaquettaires, à la condition bien entendu que cette lyophilisation ne nuise pas à leur activité; *Klein* et ses collaborateurs qui ont été les premiers et principaux défenseurs de la méthode (1956), *Gross et Schwick* estiment que les résultats sont satisfaisants chez les malades présentant des hémorragies par thrombopénie, puisque dans 50 % des cas environ de telles plaquettes lyophilisées assureraient l'hémostase; en fait *Klein* lui-même reconnaît que le petit nombre de cas ne permet pas de conclusion formelle et surtout il nous est apparu que ces résultats essentiellement cliniques n'étaient pas étayés par une étude précise des troubles de l'hémostase et de leur correction.

A Lyon, depuis 2 ans, nous commençons à préparer et à utiliser des concentrés plaquettaires lyophilisés; plus de 50 lots de concentrés plaquettaires de 40 à 50 cm³, riches de 6-10 000 000 par mm³ ont été ainsi préparés et 25 malades traités, soit sous notre contrôle direct, soit par d'autres médecins; d'emblée nous avons été frappés par le peu d'efficacité apparente de ces suspensions et ceci nous a incités à pousser plus loin leur étude par un contrôle *in vitro* et *in vivo* d'un certain nombre de tests d'hémostase liés à l'activité plaquettaire.

C'est cette expérience que nous rapportons ici, nous verrons successivement le mode de préparation de ces concentrés plaquettaires, l'étude *in vitro* de leur action correctrice sur des plasmas déplaquettés, l'étude *in vivo* enfin de leur efficacité, tant sur le plan clinique que sur le plan du laboratoire.

A. — Méthodes de récolte et de préparation des concentrés plaquettaires lyophilisés

Nous avons depuis longtemps adopté la technique de *Maupin*, commode, assez rapide, au rendement satisfaisant (50 % en moyenne).

Le sang des donneurs est recueilli sur mélange ACD, dans la proportion de 50 cm³ pour 350 de sang, en flacons siliconés; il est traité dans les 2 heures qui suivent le prélèvement.

Une première centrifugation à 2500 tours pendant 30' entraîne le rassemblement des plaquettes (et des globules blancs), à la limite de séparation des globules rouges et du plasma; cette portion est prélevée avec le système de *Maupin* (piston liquide glucosé chassant le sang de bas en haut dans un tube progressivement rétréci); la crème globulaire provenant de plusieurs flacon est ainsi réunie en un seul flacon, qui est centrifugé 20' à 2500 tours; on obtient 3 couches (plasma, plaquettes, globules blancs et rouges); la couche plaquettaire est recueillie dans un nouveau récipient grâce encore au système de *Maupin*.

Cette crème plaquettaire est numérotée (en moyenne 7 à 10000000 de plaquettes par mm³). Elle est ensuite lyophilisée en coquille à -50°, la déshydratation complète étant en pratique obtenue sans chauffage.

Toutes ces opérations se font à +10° C pour les centrifugations, à la température du laboratoire pour les autres manipulations. Tous les récipients sont siliconés. Des lavages successifs (1 lavage au complexon, puis 3 lavages à l'eau physiologique) recommandés en particulier par *Klein* pour éliminer la sérotonine nocive, ont été pratiqués parfois avant dessiccation et nous verrons leur influence sur la valeur des plaquettes.

Enfin, nous signalerons que des essais pour juger de l'influence de la solution anticoagulante nous ont montré que le citrate de soude seul donnait les mêmes résultats que la solution ACD, mais que l'oxalate était nettement moins favorable.

Voyons maintenant quelle est la valeur *in vitro* et *in vivo* de ces suspensions plaquettaires, dont nous avons préparé depuis 2 ans plus de 50 lots différents.

B. — Contrôle *in vivo*

1° Méthodes

Parmi les diverses qualités et propriétés des plaquettes, qui permettent de juger de leur valeur fonctionnelle, nous avons étudié essentiellement, pour chaque lot préparé :

- *L'aspect morphologique* soit en contraste de phase, soit sur lame étalée.
- *L'action sur la thromboplastino-formation* en utilisant plusieurs procédés qui se recoupent : la consommation de prothrombine suivant la méthode de *Quick et Favre-Gilly* en un temps, le test de génération de thromboplastine de *Biggs et Douglas*, la correction du test à l'héparine de *Soulier* d'un plasma déplaquetté, le test d'activité plaquettaire du sérum d'*O'Brien*, jugeant de la correction de la consommation de prothrombine d'un plasma déplaquetté par un sérum recueilli après coagulation du plasma plaquetté à étudier.

La consommation de prothrombine est exprimée par le temps de *Quick* du sérum résiduel ; les autres tests sont exprimés par une série de courbes.

Nous ajouterons que la correction du test à l'héparine permet de juger non seulement l'activité thromboplastique des plaquettes étudiées, mais aussi leur pouvoir antihéparinique :

- *L'action sur la rétraction du caillot*, suivant la méthode de *Jones* modifiée, permettant de juger de l'intensité de la rétraction (de O, +, ++, +++, ++++) pour des concentrations plaquettaires allant de O à 1500000 par mm³.
- *Le thrombéléistogramme* nous a paru enfin une méthode extrêmement précieuse pour juger de la valeur des suspensions plaquettaires, le temps de réaction (r) mesurant surtout la thromboplastinoformation, l'élasticité maxima (Em x) jugeant la valeur adhésive des plaquettes et étant parallèle à la rétraction du caillot.

2° Résultats

L'étude morphologique sur lames montre des altérations notables, beaucoup plus marquées pour des plaquettes lyophilisées ; déjà on est frappé par l'altération plus grande des plaquettes lavées que des plaquettes non lavées, ceci aussi bien avant qu'après lyophilisation.

En contraste de phase, les plaquettes fraîches non lavées ont un comportement normal, émettant des pseudopodes, se fixant et s'étalant dans les délais habituels ; les mêmes plaquettes fraîches, après lavage, sont pour la plupart en gros amas et altérées ; seules quelques-unes restent mobiles, mais aucune ne se fixe ni ne s'étale. La même différence se retrouve entre plaquettes lyophilisées, suivant qu'elles ont

été lavées ou non au préalable, étant bien entendu qu'après lyophilisation les signes de vie plaquettaire sont de toutes façons très réduits et retrouvés sur quelques éléments seulement.

Les tests de thromboplastino-formation, qui sont de beaucoup les plus employés par les divers auteurs et qui sont à l'origine de l'opinion que les plaquettes lyophilisées gardent toute leur activité, montrent en effet que ces dernières, qu'elles aient été lavées ou non, ont toujours une activité thromboplastique parfaite, parfois même plus importante après dessiccation qu'avant.

La capacité d'entraîner la rétraction du caillot, qui persiste toujours sur les plaquettes fraîches non lavées, disparaît au contraire complètement avec la lyophilisation; en outre elle disparaît également de façon complète dès après lavage, alors même qu'il s'agit de plaquettes fraîches; ce point nous paraît particulièrement important.

Le thrombéléstogramme, qui nous semble, de ce fait, le plus commode et le meilleur test d'activité plaquettaire, objective parfaitement les faits précédents: si le temps de réaction (r) est souvent corrigé par l'adjonction de plaquettes lyophilisées à un plasma déplaqueté, l'élasticité maxima au contraire n'est jamais corrigée, alors qu'elle l'est plus ou moins complètement par ces plaquettes fraîches (il faut un taux suffisant, en général au moins 1 500 000 par mm^3), à condition encore que ces plaquettes n'aient pas été lavées, car le lavage réduit toujours plus ou moins nettement cette fonction plaquettaire.

En définition les tests *in vitro*, s'ils montrent, comme il est classique, la parfaite conservation des propriétés thromboplastiques après dessiccation, apportent la preuve que d'autres propriétés plaquettaires sont détruites ou altérées par la lyophilisation, et aussi par le lavage préalable, en particulier l'adhésivité et l'action sur la rétraction du caillot; or nous estimons, et l'étude *in vivo* va le démontrer, que ce sont là les propriétés essentielles des plaquettes dans leur rôle hémostatique.

C. — Etude *in vivo*

1° Méthodes

Nous avons injecté des concentrés plaquettaires lyophilisés à plus de 20 malades, dont 16 malades suivis par nous tant cliniquement (arrêt des hémorragies et du purpura) que biologiquement.

Sur le plan biologique nous avons jugé de l'action des concentrés plaquettaires (en dehors de la numération des plaquettes qui n'a pas d'intérêt avec des plaquettes lyophilisées) par:

- le temps de saignement et la rétraction du caillot;
- la consommation de prothrombine;
- le test de tolérance à l'héparine;
- le thrombéléstogramme qui nous a paru, comme *in vitro*, le meilleur moyen d'étude de l'activité plaquettaire.

Lorsque ce fut possible (3 cas seulement) nous avons comparé chez le même malade, à 2 ou 3 jours d'intervalle, l'action des plaquettes lyophilisées avec l'action des plaquettes fraîches.

Tableau I

Expérience clinique des injections de plaquettes lyophilisées

Suspensions concentrées de plaquettes (6 à 10 000 000 par mm³)
 Quantité injectée à chaque malade: 40 à 150 cm³.

20 malades ainsi traités sans incidents

16 malades contrôlés par nos soins { 13 thrombopénies
 3 diacyclothrombopathies

13 thrombopénies

cliniquement { aucun cas d'amélioration
 aggravation des métrorragies dans 2 cas

bilans d'hémostase

{	{	{	aucune amélioration du T.S., de la rétraction du caillot tests de thromboplastino-formation:	{	{	consommation de prothrombine	amélioration: 2 cas
						inchangés: 3 cas	
						aggravés: 5 cas	
			test de tolérance à l'héparine			amélior. légère: 5 cas	
						inchangés: 4 cas	

tyrombélastogramme: { inchangé: 7 cas
 aggravé: 6 cas

comparaison avec plaquettes fraîches dans 3 cas { un succès
 un demi succès
 un échec

3 thrombopathies (diacyclothrombopathies)

{ 1 cas: amélioration clinique et du T.S. une fois; rien une autre fois
 { 2 cas: aucune amélioration sensible; dans 1 cas les plaquettes fraîches ne font pas mieux

2° Résultats

Les diverses recherches pratiquées chez 16 malades (13 thrombopénies, 3 thrombopathies du type diacyclothrombopathie) ont donné les résultats résumés dans le tableau I; ces résultats démontrent que si les plaquettes fraîches sont loin d'avoir une activité constante, peut-être du fait de la présence d'anticorps anti-plaquettes, les plaquettes lyophilisées sont pratiquement toujours inefficaces ou très peu efficaces, les seuls résultats partiels portant surtout sur les tests de thromboplastino-formation, mais sans action clinique parallèle manifeste.

Summary

Four years' experience allows us to report on the efficacy of platelet concentrates prepared and used in the hours immediately following their sampling. Their action is very short lasting (a few days at most) and even more so when anti-platelet antibodies exist, but their injection often stops a haemorrhage of thrombopenic origin.

In contrast, the same concentrates used after lyophilization appeared to be much more misleading, more often than not incapable of stopping a haemorrhagic syndrome and of modifying haemostatic disturbances, which sometimes even appeared to deteriorate. This is all the more regrettable as lyophilized platelets would be a therapeutic agent of easy preservation and use, whenever difficulties in preparation and the necessity of immediate use of fresh platelet concentrations do not considerably reduce their practical interest.