



OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/21843>

**To cite this version:**

Faure, Justine. *Comparaison des résultats d'hémogramme obtenus à partir de spécimens sanguins prélevés sur EDTA à la veine coccygienne ou jugulaire chez les bovins et plus précisément des numérations et des agrégats plaquettaires observés sur les frottis sanguins à T0h, T6h et T24h*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2018, 45 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr](mailto:tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr)

# COMPARAISON DES RESULTATS D'HEMOGRAMME OBTENUS A PARTIR DE SPECIMENS SANGUINS PRELEVES SUR EDTA A LA VEINE COCCYGIENNE OU JUGULAIRE CHEZ LES BOVINS ET PLUS PRECISEMENT DES NUMERATIONS ET DES AGREGATS PLAQUETTAIRES OBSERVES SUR LES FROTTIS SANGUINS A T0H, T6H, ET T24H

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**FAURE Justine**

Née, le 01 juillet 1992 à CLERMONT-FERRAND (63)

---

**Directeur de thèse : Mme Catherine TRUMEL**

---

## JURY

PRESIDENT :

**Mme Monique COURTADE SAÏDI**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Catherine TRUMEL**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Mme Nathalie BOURGES-ABELLA**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Alimentation  
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : Madame Isabelle CHMITELIN

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*  
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

## MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*  
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*  
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*  
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*  
Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*  
M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*  
M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*

## **Remerciements**

### **A la Présidente du Jury,**

Madame la Professeure Monique COURTADE SAIDI,

Professeure à l'Université Paul Sabatier,

Histologie,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

### **A notre jury de thèse,**

Madame la Professeure Catherine TRUMEL,

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Biologie Médicale Animale et Comparée,

Pour avoir accepté la direction de cette thèse, pour votre encadrement, votre aide précieuse, et votre gentillesse, nous tenons à vous remercier chaleureusement et à vous exprimer notre profond respect.

Madame la Professeure Nathalie BOURGES-ABELLA,

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Histologie, Anatomie pathologique,

Nous tenons à vous remercier sincèrement d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

### **Aux personnes impliquées dans la réalisation de ce travail,**

Monsieur le Professeur Jean-Pierre BRAUN,

Professeur honoraire à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Physique et chimie biologiques et médicales,

Pour votre travail très précieux sur les statistiques de cette thèse et leur interprétation, nous vous remercions très sincèrement.

Au personnel du Laboratoire Central de Biologie Médicale,

Nous sommes reconnaissants pour votre travail, votre disponibilité et votre assistance dans la réalisation des analyses sanguines.

Aux internes et résidents du service de Pathologie des ruminants,

Nicolas, Guillaume, Enrico, un grand merci pour votre soutien, votre disponibilité qui nous ont été d'une aide très précieuse pour la réalisation des prélèvements de sang.

**Et enfin,**

A ma famille, à mes amis, à la mémoire de ceux qui regardent d'en haut... « On ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux. » Le Petit Prince – A. de Saint-Exupéry.

## Table des matières

Table des matières.....	- 7 -
Table des figures.....	- 8 -
Table des tableaux.....	- 8 -
Table des annexes.....	- 9 -
Abréviations.....	- 10 -
1 Introduction.....	- 11 -
2 Partie bibliographique.....	- 13 -
2.1 L'agrégation plaquettaire : généralités.....	- 13 -
2.1.1 L'agrégation plaquettaire <i>in vivo</i> .....	- 13 -
2.1.2 L'agrégation plaquettaire <i>in vitro</i> .....	- 15 -
2.1.3 Les voies d'inhibition de l'agrégation plaquettaire.....	- 16 -
2.2 Le CTAD.....	- 17 -
2.3 Le bovin : une espèce sensible à l'agrégation plaquettaire <i>in vitro</i> ?.....	- 18 -
3 Partie expérimentale.....	- 20 -
3.1 Prélèvement des spécimens.....	- 20 -
3.2 Analyses.....	- 20 -
3.2.1 Contrôles de qualité.....	- 20 -
3.2.2 Critères d'exclusion au laboratoire.....	- 21 -
3.2.3 Procédures effectuées sur chaque spécimen.....	- 21 -
3.3 Interprétation des résultats scientifiques – statistiques.....	- 22 -
4 Résultats.....	- 23 -
4.1 Description de la population.....	- 23 -
4.2 Effets de la durée de conservation et du site de ponction sur l'Indice d'Agrégation Plaquettaire.....	- 24 -
4.3 Effets des covariables sur la numération plaquettaire.....	- 25 -
4.3.1 Effets de l'IAP sur la numération plaquettaire.....	- 26 -
4.3.2 Effets de la durée de conservation sur la numération plaquettaire.....	- 27 -
4.4 Comparaison des deux techniques de comptage des plaquettes.....	- 27 -
5 Discussion.....	- 30 -
Conclusion.....	- 34 -
Références.....	- 36 -
Annexes.....	- 39 -

## Table des figures

<b>Figure n°1</b> : Agrégation plaquettaire en condition de turbulences.....	-14-
<b>Figure n°2</b> : Voies d'inhibition de l'agrégation plaquettaire.....	-17-
<b>Figure n°3</b> : Statistiques descriptives de la population de bovins utilisée.....	-24-
<b>Figure n°4</b> : Agrément entre les numérations plaquettaires de sang de bovin par technique optique (PLT-O) ou d'impédance (PLT-I) .....	-28-
<b>Figure n°5</b> : Diagramme de différence de Bland-Altman entre les comptages plaquettaires PLT-I et PLT-O de sang de bovin.....	-29-

## Table des tableaux

<b>Tableau n°1</b> : Statistiques descriptives de l'effet du temps de conservation pendant 6 et 24 heures sur l'Indice d'Agrégation Plaquettaire de sang de bovin.....	-25-
<b>Tableau n°2</b> : Variations du nombre et du pourcentage de spécimens ayant un IAP $\leq 2$ ou $> 2$ en fonction de la durée de conservation des spécimens de sang de bovin à 0h, 6h et 24h de conservation.....	-25-
<b>Tableau n°3</b> : Variations de PLT-I ( $10^9/L$ ) en fonction de l'Indice d'Agrégation Plaquettaire.....	-26-
<b>Tableau n°4</b> : Variations de PLT-O ( $10^9/L$ ) en fonction de l'Indice d'Agrégation Plaquettaire.....	-26-
<b>Tableau n° 5</b> : Différences des numérations plaquettaires PLT-I et PLT-O ( $10^9/L$ ) dans le sang de bovin en fonction de l'IAP ( $\leq 2$ ou $> 2$ ) .....	-27-
<b>Tableau n°6</b> : Variations des numérations plaquettaires PLT-I et PLT-O ( $10^9/L$ ) en fonction de la durée de conservation.....	-27-



## **Table des annexes**

<b>Annexe n°1</b> : Descriptif de la population de bovins utilisée.....	-39-
<b>Annexe n°2</b> : Fiche d'accompagnement des prélèvements de chaque bovin.....	-40-
<b>Annexe n°3</b> : Méthode de réalisation du frottis sanguin utilisée dans ce travail.....	-41-
<b>Annexe n°4</b> : Méthode d'estimation de la taille des amas plaquettaires observés sur le frottis.....	-42-
<b>Annexe n°5</b> : Feuille d'analyse présentant les résultats obtenus pour chaque bovin.....	-43-
<b>Annexe n°6</b> : Données brutes regroupant les résultats de numération plaquettaire par méthode de variation d'impédance (PLT-I), optique (PLT-O), et le degré d'agrégation plaquettaire (IAP) .....	-44-

## **Abréviations**

**ADP** : Adénosine DiPhosphate ;

**ATP** : Adénosine TriPhosphate ;

**AMPc** : Adénosine MonoPhosphate cyclique ;

**Ca<sup>2+</sup>** : ion calcium ;

**CTAD** : Citrate de sodium, Théophylline, Adénosine et Dipyridamole ;

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique ;

**FvW** : Facteur de von Willebrand ;

**GMPc** : Guanosine MonoPhosphate cyclique ;

**GP** : Glycoprotéine ;

**IAP** : Indice d'Agrégation Plaquettaire ;

**Ig** : Immunoglobuline ;

**NO** (nom anglais): oxyde d'azote ;

**OCS** (nom anglais) : système canaliculaire ouvert ;

**PG** : Prostaglandine ;

**PK** : Protéine Kinase ;

**PLT-I** : comptage plaquettaire obtenu par technique de variation d'impédance ;

**PLT-O** : comptage plaquettaire obtenu par technique optique ;

**VASP** (nom anglais): phosphoprotéine stimulée par la vasodilatation.

# **1 Introduction**

Les plaquettes sont des cellules sanguines anucléées chez les Mammifères impliquées dans la coagulation sanguine. Elles ont un rôle essentiel : elles entrent dans la formation du thrombus blanc lors de l'hémostase primaire grâce, entre autre, à leur capacité à agréger.

La numération plaquettaire est obtenue lors de la réalisation de l'hémogramme. C'est un examen complémentaire de choix pour aider au diagnostic d'un bon nombre d'affections aussi bien en médecine canine qu'en médecine bovine. Or la numération plaquettaire est parfois difficile à interpréter à cause de la présence d'agrégats plaquettaires. Il a été mis en évidence lors d'une précédente étude réalisée à l'ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) une tendance à l'agrégation plaquettaire dans le sang de plus de 80% des bovins prélevés à la veine coccygienne. Il est donc important d'analyser précisément les conditions pré-analytiques de la réalisation d'un hémogramme.

C'est ainsi que s'est posé la question de trouver une nouvelle méthode de prélèvement chez les espèces prédisposées à la formation d'agrégats plaquettaires. Une première analyse nous a permis d'identifier que le site de prélèvement de sang, le type d'anticoagulant et le délai d'analyse pouvaient avoir une influence sur cette agrégation. Aucune étude visant à comparer les anticoagulants n'a été réalisée chez les bovins, mais de précédents travaux chez l'Homme et le chat ont montré l'efficacité du CTAD (Citrates de sodium, Théophylline, Adénosine et Dipyridamole) pour limiter la formation d'agrégats *in vitro*. La plupart des travaux ayant permis l'établissement des intervalles de référence d'hémogramme chez le bovin ont été réalisés grâce à des prélèvements de sang effectués à la veine jugulaire, sans que la présence d'agrégats n'ait été rapportée. Notre postulat est donc que le prélèvement à la veine jugulaire générerait moins d'agrégats plaquettaires qu'à la veine coccygienne. Enfin dans l'étude réalisée à l'ENVT, le délai entre prélèvement et analyse variait de 4 à 24h ce qui a permis de suspecter un possible effet du temps de conservation sur la formation d'agrégats.

Le but de cette étude a donc été de comparer le degré d'agrégation plaquettaire et la numération des plaquettes chez le bovin à partir de sang prélevé à la veine

coccygienne ou à la veine jugulaire, sur des tubes EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétracétique) ou CTAD à T<sub>0h</sub>, T<sub>6h</sub> et T<sub>24h</sub> après prélèvement.

Après un rappel sur l'agrégation plaquettaire *in vitro* et un état des connaissances sur le fonctionnement et l'efficacité du CTAD chez d'autres espèces, le protocole expérimental et les résultats obtenus seront rapportés. Ils seront ensuite discutés pour envisager une exploitation pratique.

## 2 Partie bibliographique

### 2.1 L'agrégation plaquettaire : généralités

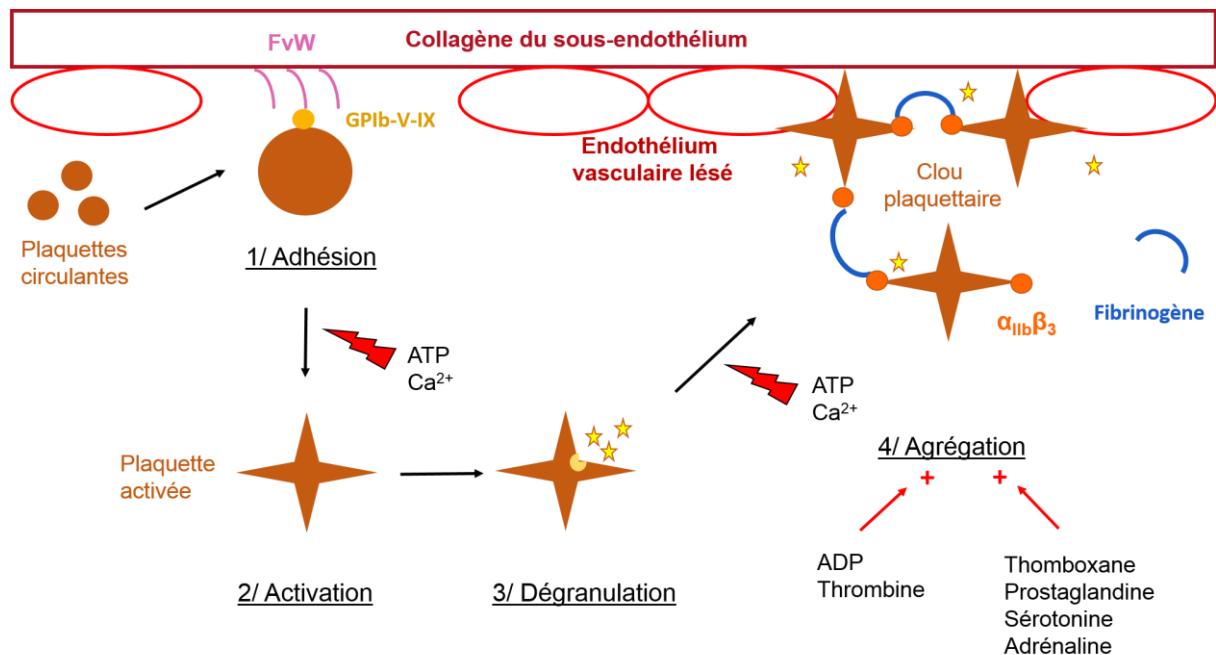
#### 2.1.1 L'agrégation plaquettaire *in vivo*

Les plaquettes sont des cellules sanguines discoïdes anucléées de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre, synthétisées dans la moelle osseuse par fragmentation cytoplasmique des mégacaryocytes. Elles ont une capacité d'adhésion à la surface endothéliale et d'auto-agrégation permises par la structure caractéristique de leur membrane cellulaire.

Suite à l'apparition d'une brèche vasculaire, la réparation va être permise par la mise en place de l'hémostase primaire et de la coagulation plasmatique afin de limiter les pertes sanguines. L'hémostase primaire est la réponse d'urgence à la rupture de l'intégrité d'un vaisseau sanguin. Les vaisseaux sont composés d'une couche de cellules endothéliales au repos, au contact du sang. Cette couche est dite hémocompatible puisqu'en situation normale, elle ne va pas déclencher l'hémostase primaire. Cependant, en cas de brèche vasculaire, les cellules endothéliales vont s'activer et exprimer des substances pro-thrombotiques à leur surface membranaire mais aussi dans le milieu environnant. Il va alors y avoir contact entre le sang et les structures sous-endothéliales (couche de cellules musculaires lisses et couche externe formée de tissu conjonctif) qui sont, elles aussi, pro-thrombotiques. Cela va entraîner la formation d'un « clou plaquettaire » en plusieurs étapes détaillées ci-dessous [6, 30].

- Le temps vasculaire : Tout d'abord, il va y avoir une vasoconstriction du vaisseau lésé, permettant de limiter les pertes sanguines, et laissant l'opportunité aux autres acteurs de l'hémostase primaire d'agir grâce au ralentissement du flux sanguin.
- Le temps plaquettaire (**Figure n°1**) : Lorsque le flux sanguin est linéaire, les plaquettes circulantes vont se fixer à la surface sous-endothéliale lésée via l'interaction entre les récepteurs membranaires  $\alpha_2\beta_1$  ou GPIV (GlycoProtéine IV) et le collagène. En cas de turbulences, c'est le complexe plaquettaire GPIb-V-IX et le facteur von Willebrand (FvW) lui-même fixé sur le collagène du sous-endothélium, qui vont se lier l'un à l'autre de manière plus stable [28]. C'est

l'adhésion plaquettaire, qui est un phénomène passif. Cela va permettre la transduction d'un signal d'activation : les plaquettes vont changer de forme pour devenir ovoïdes et développer des pseudopodes. Elles vont ensuite libérer, via un système canaliculaire ouvert (OCS), le contenu de leurs granules cytoplasmiques composé de substances favorisant l'agrégation, la coagulation et la vasoconstriction [33]. Le fibrinogène va alors pouvoir former des ponts entre les plaquettes par liaison au récepteur plaquettaire  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , conduisant ainsi à l'agrégation plaquettaire. L'activation et l'agrégation plaquettaires sont des phénomènes actifs nécessitant de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate) et la présence d'ions  $Ca^{2+}$  intra-cytoplasmiques. L'agrégation plaquettaire est potentialisée par l'intervention de médiateurs tels que l'ADP (Adénosine DiPhosphate) et la thrombine, puis va être amplifiée par d'autres molécules comme les thromboxanes et les prostaglandines (formés à partir d'acide arachidonique), ainsi que la sérotonine ou l'adrénaline.



**Figure n°1 : Agrégation plaquettaire en condition de turbulences (d'après Thijs et al, 2010 et Collet et al, 2004).**

Cependant, le « clou plaquettaire » est une structure fragile qui nécessite d'être renforcée afin de permettre une réparation durable de la brèche vasculaire. C'est la coagulation plasmatique qui va permettre cela, via la formation de fibrine insoluble à partir du fibrinogène soluble circulant grâce à l'activation d'une enzyme : la thrombine. Le caillot de fibrine ainsi formé sera ensuite lysé par la plasmine lors de la fibrinolyse physiologique.

Les troubles de l'hémostase primaire sont d'une importance majeure en médecine humaine et vétérinaire car ils peuvent avoir des conséquences cliniques catastrophiques s'ils ne sont pas pris en charge rapidement. La fiabilité d'un diagnostic de thrombocytopénie est donc essentielle.

### 2.1.2 L'agrégation plaquettaire *in vitro*

Le diagnostic des troubles hémostatiques est fondé sur le fait que les variables sanguines mesurées *in vitro* sont le reflet de ce qu'il se passe *in vivo*. En réalité une activation plaquettaire *in vitro* pouvant conduire à une agrégation est fréquente, alors même que l'animal ne présente pas de trouble de l'hémostase. Cela serait dû notamment aux conditions pré-analytiques auxquelles est soumis un spécimen sanguin. En effet, il a été démontré dans certaines études un phénomène d'agrégation spontané plus important suite à l'utilisation de citrate comme anticoagulant. Ensuite, il a été mis en évidence qu'une agrégation des plaquettes commençait dès les premières minutes suivant la collection du sang [7, 32]. De plus chez le chien, une formation d'agrégats plus importante dans les spécimens de sang stockés à 4°C plutôt qu'à 25°C a été relevée [22]. Enfin chez l'homme, une incubation à 37°C permet une diminution de l'agrégation plaquettaire [4, 32].

De plus, il a été découvert chez l'homme le phénomène de pseudothrombocytopénie lié à l'EDTA chez des patients ne présentant aucun trouble clinique. L'EDTA est un anticoagulant qui chélate les ions  $Ca^{2+}$ , substrat essentiel au déroulement de l'hémostase. De manière paradoxale, il a été montré un phénomène d'agrégation plaquettaire *in vitro* en sa présence. Une des explications possibles à cette agrégation spontanée *in vitro* semble alors être qu'en présence d'EDTA, un site de liaison normalement masqué soit révélé suite à un changement de conformation du

récepteur plaquettaire  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (impliqué dans le phénomène d'agrégation). Cet épitope va servir de ligand à des Ig (immunoglobulines) présentes dans le tube de sang entraînant ainsi une agrégation des plaquettes et la formation d'amas plaquettaires *in vitro*, en l'absence de fibrinogène [4, 32].

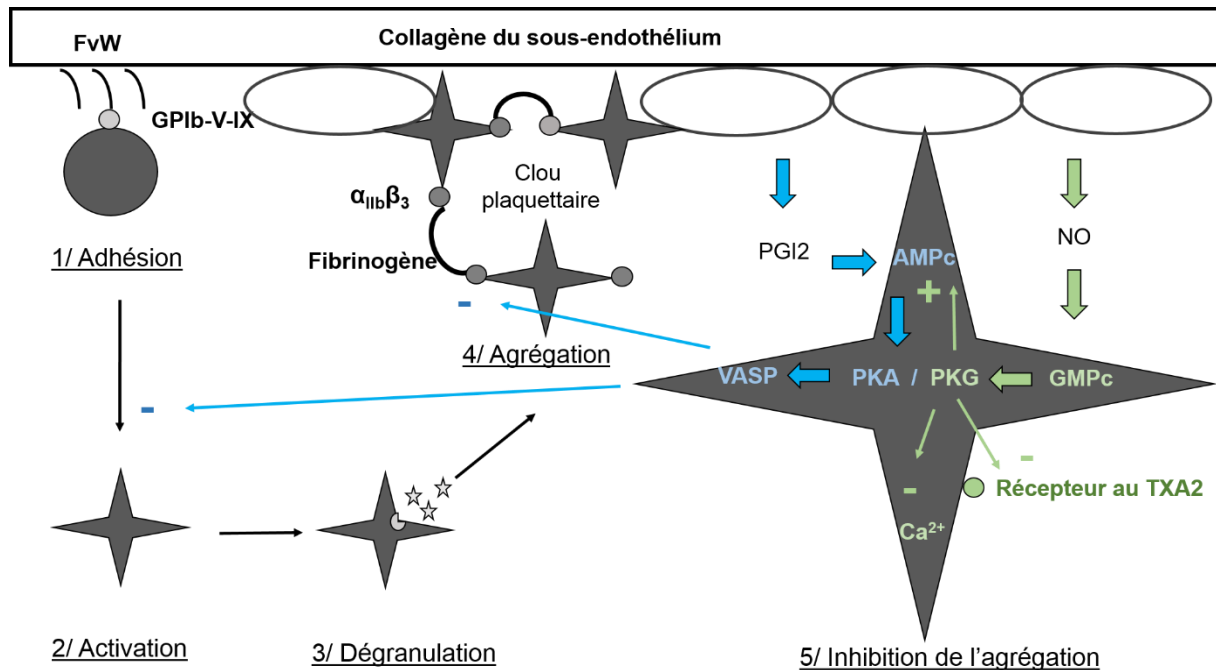
En conclusion, l'agrégation plaquettaire observée *in vitro* en l'absence de tout trouble de l'hémostase, serait due à des conditions pré-analytiques la favorisant car conduisant à une activation des plaquettes puis à la formation d'agrégats.

### 2.1.3 Les voies d'inhibition de l'agrégation plaquettaire

Le signal d'amplification et les mécanismes de recrutement plaquettaire nécessitent un contrôle étroit pour cloisonner l'agrégation localement. Pour cela plusieurs mécanismes sont mis en place (**Figure n°2**). Tout d'abord, la couche de cellules endothéliales est capable d'inhiber l'activation de l'hémostase primaire via une charge ionique négative des membranes cellulaires et l'agencement anti-adhésif des protéines de surface. Ensuite, il y a une production locale de médiateurs antiagrégants, ce qui va limiter le signal d'amplification et les mécanismes de recrutement plaquettaire. Les cellules endothéliales produisent en effet des PGI<sub>2</sub> (prostacyclines) qui vont se fixer aux plaquettes et augmenter les concentrations intracellulaires en AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) qui est un puissant inhibiteur de l'activation plaquettaire. Cela va permettre l'activation d'une protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) qui va à son tour conduire à l'activation d'une phosphoprotéine stimulée par la vasodilatation (VASP). VASP peut alors empêcher le changement de forme des plaquettes lors de l'adhésion ainsi que la liaison avec le fibrinogène, conduisant à une inhibition de l'agrégation plaquettaire. De plus, les cellules endothéliales peuvent libérer de l'oxyde d'azote (NO) qui va agir sur les plaquettes et permettre l'augmentation des concentrations intracellulaires en GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique). Le GMPc va ensuite activer la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) qui peut inhiber le relargage de Ca<sup>2+</sup>, substrat essentiel à l'agrégation plaquettaire, et favoriser son stockage. Cette enzyme peut aussi bloquer le récepteur au TXA<sub>2</sub> (thromboxane A<sub>2</sub>) limitant ainsi l'activation et l'agrégation des plaquettes. Enfin, le GMPc peut augmenter indirectement les concentrations en AMPc et permettre l'activation de VASP [6, 28]. Ces cascades d'inhibition de l'agrégation



plaquettaire *in vivo* sont donc importantes à prendre en compte afin de limiter le phénomène *in vitro*.



**Figure n°2 : Voies d'inhibition de l'agrégation plaquettaire** (d'après *Thijs et al, 2010*).

Or comme évoqué dans le paragraphe 1.1.2, les anticoagulants de routine ne suffisent souvent pas à prévenir l'agrégation plaquettaire *in vitro*. L'étude d'un nouveau type d'anticoagulant s'inspirant de ces voies d'inhibition pourrait être judicieuse pour pouvoir obtenir des résultats hématologiques de meilleure fiabilité.

## 2.2 Le CTAD

Comme dit précédemment, le fait que les plaquettes soient capables de s'agréger *in vitro* peut engendrer une sous-estimation du comptage plaquettaire, et ainsi une fausse thrombopénie. De plus chez certaines espèces comme l'homme, le chat, le cheval ou encore le porc, la taille des amas plaquettaires formés peut être similaire à celle des globules rouges ou des globules blancs et ainsi fausser également le reste

de la formule sanguine. Il est donc important de réduire l'incidence des agrégats plaquettaires présents dans les spécimens sanguins avant analyse [13, 32]. On a vu que les conditions pré-analytiques pouvaient influencer la formation d'agrégats *in vitro*, et qu'un anticoagulant développé spécifiquement pour limiter l'agrégation plaquettaire serait intéressant.

Le CTAD est un anticoagulant formé de citrate de sodium, de théophylline, d'adénosine et de dipyridamole. La théophylline, le dipyridamole et l'adénosine vont permettre d'augmenter la concentration plaquettaire en AMPc. Le CTAD permet ainsi une inhibition de l'activation, de l'adhésion et de l'agrégation des plaquettes via les mécanismes vus au paragraphe 1.1.3 [9, 18]. Il pourrait être un anticoagulant presque universel chez l'homme et le chat. En effet il permet l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et donc l'obtention d'un hémogramme de qualité, mais aussi la réalisation de certaines analyses biochimiques et de bilans de coagulation sanguine au même titre que les anticoagulants utilisés en routine en médecine humaine et vétérinaire [8, 12].

### 2.3 Le bovin : une espèce sensible à l'agrégation plaquettaire *in vitro* ?

Il est bien connu que certaines espèces, comme l'homme, le cheval ou le chat, ont une prédisposition à l'agrégation plaquettaire *in vitro* après prélèvement sanguin [9, 23, 24]. Les données récoltées dans la littérature suggèrent qu'elle est en revanche difficile à obtenir chez le bovin [23, 27]. Cela pourrait être expliqué par une différence d'ultrastructure entre les plaquettes bovines et celles de l'homme. En effet, les plaquettes de bovins sont plus petites et les constituants présents dans leurs granules ne sont pas dans les mêmes proportions que chez l'homme [17]. Contrairement à ce dernier, les bovins n'ont pas de système membranaire canaliculaire ouvert (OCS) qui permet une mobilisation rapide des granules cytoplasmiques [2, 33]. La libération du contenu des granules se fait plutôt par exocytose à la surface membranaire [31], ce qui mettrait en jeu d'autres voies que celles communément connues dans l'espèce humaine et présentées dans le paragraphe 2.1.1. L'agrégation plaquettaire chez les bovins semble plus fortement dépendante de la présence de thrombine que dans d'autres espèces animales [25]. Une étude a également montré un temps de céphaline activé plus court que chez l'homme, et un temps d'activation des plaquettes plus long

[19], ce qui suggère une mise en place plus lente de l'hémostase primaire. De plus, il semble que les plaquettes bovines soient presque insensibles à la plupart des agents agrégants couramment utilisés *in vitro* (ADP, adrénaline, acide arachidonique). La formation d'un caillot dans l'espèce bovine dépendrait donc moins de la mise en place de l'hémostase primaire que chez d'autres espèces comme l'homme, et plus de l'hémostase secondaire [17, 26].

Cependant de manière tout à fait paradoxale, il a été remarqué lors de diverses études réalisées à l'ENVT ou des analyses de routine menées au LBCM (Laboratoire Central de Biologie Médicale), une agrégation plaquettaire *in vitro* chez près de 80% des bovins après prélèvement à la veine coccygienne [14]. De précédentes études chez le bovin ont été réalisées grâce à des prélèvements de sang effectués à la veine jugulaire, sans que la présence d'amas plaquettaires n'ait été mentionnée. De plus, dans l'étude d'*Herman et al*, le délai entre prélèvement et analyse variait de 4 à 24h. Ces observations nous ont ainsi conduits à remettre en cause les conditions pré-analytiques des études menées à l'ENVT: le type d'anticoagulant utilisé peut-il avoir une influence sur la formation d'agrégats plaquettaires *in vitro* ? Le site de prélèvement du sang joue-t-il un rôle dans cette agrégation ? Le délai entre l'analyse et le prélèvement du spécimen sanguin peut-il la favoriser ? Le but de cette étude a donc été de comparer le degré d'agrégation plaquettaire et la numération des plaquettes chez le bovin à partir de sang prélevé à la veine coccygienne ou à la veine jugulaire, sur des tubes EDTA ou CTAD à T<sub>0h</sub>, T<sub>6h</sub> et T<sub>24h</sub>.

### **3 Partie expérimentale**

Il s'agit d'une étude prospective portant sur des spécimens de sang total prélevés sur EDTA et CTAD à la veine coccygienne et jugulaire provenant de 45 bovins malades hospitalisés à l'ENVT. Un descriptif de la population est disponible en **Annexe n°1**.

#### **3.1 Prélèvement des spécimens**

Les spécimens ont été prélevés dans un ordre aléatoire à la queue ou à la jugulaire sur un tube EDTA (Vacutainer® ; BD ; Plymouth, UK) et CTAD (Vacuette® ; Greiner Bio-one GmbH, Kremsmunster, Austria) à l'aide d'un porte-tube et d'aiguilles (Vacutainer Systems® PrecisionGlide TM 1.2\*25mm (18G1")). Pour ce faire, la détermination de l'ordre jugulaire *versus* queue ainsi que l'ordre de remplissage des tubes EDTA *versus* CTAD a été réalisée à l'aide du logiciel Excel® grâce à la formule ALEA, et est présentée en **Annexe n°1**. Ils ont été nommés respectivement JE1 (tube EDTA à la jugulaire), JC1 (tube CTAD à la jugulaire), QE1 (tube EDTA à la queue) et QC1 (tube CTAD à la queue) pour le bovin 1, et ainsi de suite. Les animaux ont été prélevés le matin entre 7h et 8h30, par le même opérateur. Ils ont été tenus à la tête par une aide. Les tubes ont été homogénéisés immédiatement une dizaine de fois.

Pour chaque bovin, le numéro de dossier, l'âge, la race et le sexe ont été notés sur la fiche d'accompagnement présentée en **Annexe n°2**, et un numéro d'étude BOCE 1, BOCE 2, ... BOCE X a été attribué. Les spécimens sanguins ont été amenés au LCBM (Laboratoire Central de Biologie Médicale) dans l'heure qui suivait le prélèvement et l'heure d'arrivée a été notée sur la fiche d'accompagnement.

#### **3.2 Analyses**

##### **3.2.1 Contrôles de qualité**

Le Sysmex XT2000iV® a été contrôlé chaque matin par des techniciens habilités selon le protocole de routine du laboratoire : 1 niveau de contrôle a été effectué. Si une ou plusieurs mesures de contrôle étaient en dehors des cibles fournies par le fabricant, les diverses opérations correctrices prévues par le fabricant ont été mises

en œuvre pour s'assurer du bon fonctionnement des mesures jusqu'à résolution du problème et obtention des résultats de contrôle dans les cibles.

### 3.2.2 Critères d'exclusion au laboratoire

Les tubes ayant un volume de sang insuffisant ou trop important ainsi que les tubes présentant un caillot visible macroscopiquement ont été exclus de l'étude.

### 3.2.3 Procédures effectuées sur chaque spécimen

Dès leur arrivée au LBCM, les 4 spécimens de sang de chaque bovin ont été placés pendant 30 minutes sur l'agitateur (Speci Mix<sup>λ</sup>®, Oxford, CT06478 USA). Les analyses ont été faites selon les modalités suivantes.

Une analyse à T0, après 10 retournements, a été effectuée sur le Sysmex XT2000iV®. Deux frottis sanguins pour chaque prélèvement ont également été réalisés puis colorés comme décrit en **Annexe n°3**. Ils ont ensuite été conservés dans une boîte prévue pour l'étude. Pour chaque bovin, il y a donc eu 4 passages sur l'analyseur et 8 frottis réalisés. Il a été reporté sur la fiche d'accompagnement du bovin l'heure de réalisation des analyses ainsi que les résultats de numérations plaquettaires (optique et variation d'impédance). Les prélèvements ont ensuite été placés à 4°C pendant 5h puis remis à agiter pendant 30 minutes. Les analyses ont été renouvelées comme mentionné précédemment. Les prélèvements ont ensuite été replacés à 4°C pendant 17h puis remis à agiter pendant 30 minutes. Les analyses ont été renouvelées comme mentionné précédemment.

Une photocopie de tous les résultats d'analyse ainsi que toutes les fiches d'accompagnement ont été conservées dans un cahier de manipulation. Un fichier Excel® a été rempli régulièrement pendant toute la durée de l'étude. Il est composé d'une ligne par animal sélectionné, comprenant tous les résultats de numérations plaquettaires en variation d'impédance (notés PLT-I), en cytométrie de flux (notés PLT-O). Les frottis sanguins ont été lus tous en même temps à la fin des manipulations par le même opérateur. Cela a permis d'avoir une estimation semi-quantitative de l'agrégation plaquettaire ; puis de scorer les frottis en déterminant un IAP (Indice

d'Agrégation Plaquettaire) selon la procédure présentée en **Annexe n°4**. A la fin des analyses, les résultats ont été reportés sur la fiche d'analyse en **Annexe n°5**.

### 3.3 Interprétation des résultats scientifiques – statistiques

Le fichier Excel® a été transmis par e-mail à C. Trumel et J.P. Braun. Les calculs statistiques ont été effectués par J.P. Braun grâce aux logiciels Excel® et Analyse-It®.

## 4 Résultats

Afin d'étudier le degré d'agrégation plaquettaire et la numération des plaquettes chez le bovin, des prises de sang ont été effectuées à la veine coccygienne et à la veine jugulaire, sur des tubes EDTA et CTAD sur 45 animaux malades hospitalisés à l'ENVT dont la contention était assurée par une aide. Du fait d'une erreur de manipulation, seuls les résultats sur tubes EDTA vont être présentés par la suite. Pour cela, pour chaque bovin, une numération plaquettaire a été faite à chaque temps de conservation ( $T_{0h}$ ,  $T_{6h}$  et  $T_{24h}$ ), et à chaque site de prélèvement, par méthode de variation d'impédance ou optique. De même, un frottis a été réalisé pour chaque durée de conservation et pour chaque site de prélèvement afin d'évaluer l'IAP (Indice d'Agrégation Plaquettaire).

Les résultats bruts ont été décrits par les statistiques descriptives habituelles et sont présentés en **Annexe n°6**. Les effets du site de ponction et de la durée de conservation sur l'IAP ont été étudiés par analyse de variance, de même que ceux de ces deux covariables et de l'IAP sur PLT-I (comptage plaquettaire par technique de variation d'impédance) et PLT-O (comptage plaquettaire par technique optique). Les résultats de PLT-I et PLT-O ont été comparés par calcul de corrélation de Spearman, agrément de Passing-Bablok et diagramme de différence de Passing-Bablok.

### 4.1 Description de la population

On constate que 95,6% des bovins sont des femelles, de races diverses mais dont 62,2% sont de race Prim'Holstein. Le pourcentage de vaches laitières est de 73,3%, contre 26,7% de bovins allaitants. Des bovins de tout âge ont été choisis, cependant un âge minimal de 7 mois a été respecté afin de rendre possible le prélèvement à la veine coccygienne, difficile sur un animal trop jeune. Un descriptif de la population est présenté en **Figure n°3**.

Sexe	Nombre	Pourcentage
Femelles	43	95,6
Mâles	2	4,4
Total	45	100,0

Figure 3a

Age	Nombre	Pourcentage
<2ans	5	11,1
2ans	4	8,9
3ans	2	4,4
4ans	7	15,6
5ans	6	13,3
6ans	9	20,0
7ans	6	13,3
> 7ans	4	8,9
Inconnu	2	4,4
Total	45	100,0

Figure 3b

Race	Nombre	Pourcentage
Montbéliarde	5	11,1
Prim'Hostein	28	62,2
Gasconne	2	4,4
Blonde d'Aquitaine	6	13,3
Limousine	1	2,2
Aubrac	1	2,2
Charolaise	1	2,2
Casta	1	2,2
Total	45	100,0

Figure 3c

Production	Nombre	Pourcentage
Laitière	33	73,3
Allaitante	12	26,7
Total	45	100,0

Figure 3d

**Figure n°3** : Statistiques descriptives de la population de bovins utilisée. 3a : Répartition de la population en fonction du sexe ; 3b : de l'âge ; 3c : de la race ; 3d : de la production.

#### 4.2 Effets de la durée de conservation et du site de ponction sur l'Indice d'Agrégation Plaquettaire

Les résultats manquent pour 8 animaux car l'Indice d'Agrégation Plaquettaire n'a pas pu être estimé du fait d'une absence de frottis pour ces bovins. Les analyses ont donc été faites sur 37 bovins. A chaque temps (0h, 6h, 24h), une numération plaquettaire a été réalisée avec chaque méthode d'analyse pour chaque site de ponction, soit 2 résultats pour PLT-I (n = 74) et PLT-O (n = 74), ce qui correspond à n = 222 en tout, pour chaque technique. De plus, deux frottis pour chaque temps de conservation et pour chaque site de ponction ont été réalisés, soit 222 frottis en tout.

L'ANOVA a montré que la durée de conservation avait un effet significatif sur l'IAP ( $p < 0,001$ ) mais que le site de ponction n'en avait pas ( $p = 0,076$ ) ; et qu'il n'y



avait pas d'interaction entre les deux covariables ( $p = 0,211$ ). Les résultats globaux en regroupant les deux sites de ponction ( $n = 222$ ) sont donnés dans le **Tableau n°1**.

**Tableau n°1** : Statistiques descriptives de l'effet du temps de conservation pendant 6 et 24 heures sur l'Indice d'Agrégation Plaquettaire du sang de bovin. Le nombre de spécimens utilisés est noté « n ».

	n	Moyenne	Ecart- type	Médiane	Minimum	Maximum	p
IAP Ts	222	2,7	1,43	3,0	0	4	
IAP T0	74	2,0	1,49	2,0	0	4	
IAP T6	74	2,8	1,36	3,0	0	4	vsT0 : 0,001
IAP T24	74	3,3	1,09	4,0	0	4	vsT0 : <0,01, vsT6 : 0,034

Cette augmentation de l'intensité de l'agrégation plaquettaire avec la durée de conservation est aussi retrouvée quand on utilise le seuil de « 2 » comme limite entre spécimens peu ou non agrégés et spécimens fortement agrégés, comme cela a été fait précédemment chez le chat [13]. Le pourcentage des spécimens ayant un IAP > 2 augmente avec le temps, comme le montre le **Tableau n°2**.

**Tableau n°2** : Variations du nombre et du pourcentage de spécimens ayant un IAP  $\leq 2$  ou  $> 2$  en fonction de la durée de conservation des spécimens de sang de bovin à 0h, 6h et 24h.

	n	IAP $\leq 2$	IAP $> 2$
T0	74	43 (58,1%)	31 (41,9%)
T6	74	23 (37,8%)	46 (62,2%)
T24	74	17 (23,0%)	57 (77,0%)

#### 4.3 Effets des covariables sur la numération plaquettaire

L'influence de la durée de conservation, de l'agrégation plaquettaire et du site de ponction sur la numération des plaquettes a été évaluée. L'ANOVA a montré un effet significatif de la durée de conservation ( $p = 0,039$ ) et de l'IAP (en utilisant le seuil de 2) ( $p = 0,013$ ) sur PLT-I mais pas sur PLT-O. Les effets du site de ponction ont été non significatifs pour les deux techniques de comptage.

### 4.3.1 Effets de l'IAP sur la numération plaquettaire

De manière globale, la numération plaquettaire a diminué lorsque l'IAP augmentait, mais cet effet étudié isolément n'est significatif que pour PLT-I ( $p < 0,001$ ) (**Tableau n°3**) et non pour PLT-O ( $p = 0,093$ ) (**Tableau n°4**). Seules les différences de PLT-I entre les spécimens ayant un IAP = 4 et ceux ayant un IAP = 0 ou 1 sont significatives ( $p = 0,015$  et  $< 0,001$  respectivement).

**Tableau n°3** : Variations de PLT-I ( $10^9/L$ ) en fonction de l'Indice d'Agrégation Plaquettaire.

IAP	n	Moyenne				
		PLT-I	Ecart-type	Médiane	Minimum	Maximum
Tous	222	386,8	186,01	361,5	4	906
0	24	466,9	139,97	441,5	293	811
1	29	484,8	148,13	472,0	63	788
2	35	378,1	183,28	387,0	18	835
3	32	398,4	204,94	354,5	80	906
4	102	339,4	185,33	316,0	4	812

**Tableau n°4** : Variations de PLT-O ( $10^9/L$ ) en fonction de l'Indice d'Agrégation Plaquettaire.

IAP	n	Moyenne				
		PLT-O	Ecart-type	Médiane	Minimum	Maximum
Tous	222	442,8	209,20	397,0	31	971
0	24	485,2	175,74	425,5	303	919
1	29	519,6	189,06	551,0	54	895
2	35	440,5	218,89	386,0	74	927
3	32	456,0	234,72	399,0	94	971
4	102	407,6	205,79	386,0	31	858

En revanche, si on utilise le seuil d'IAP  $\leq 2$  versus  $> 2$ , la différence est significative pour les deux techniques de comptage ( $p < 0,001$  et  $p = 0,039$  pour PLT-I et PLT-O) (**Tableau n°5**).

**Tableau n° 5 :** Différences des numérations plaquettaires PLT-I et PLT-O ( $10^9/L$ ) dans le sang de bovin en fonction de l'IAP ( $\leq 2$  ou  $> 2$ ).

	IAP	n	Moyenne	Ecart- type	Médiane	Minimum	Maximum
PLT-I	Ts	222	386,8	186,01	361,5	4	906
PLT-O	Ts	222	442,8	209,20	397,0	31	971
PLT-I	$\leq 2$	88	437,5	166,66	441,0	18	835
PLT-O	$\leq 2$	88	478,7	198,87	432,5	54	927
PLT-I	$> 2$	134	353,5	191,08	326,0	4	906
PLT-O	$> 2$	134	419,1	213,14	386,0	31	971

#### 4.3.2 Effets de la durée de conservation sur la numération plaquettaire

Ces analyses ont pu être réalisées sur l'ensemble des bovins prélevés ( $n = 45$ ), car l'IAP n'était pas utile ici. Lorsque la durée de conservation est étudiée séparément, on observe une diminution statistiquement significative de PLT-I ( $p < 0,001$ ) et de PLT-O ( $p = 0,013$ ) avec la durée de conservation (**Tableau n°6**). Bien que la diminution soit moins intense pour PLT-O que pour PLT-I, les pourcentages de diminution à 6 et 24 heures ne montrent pas de différence significative en fonction de la technique de comptage.

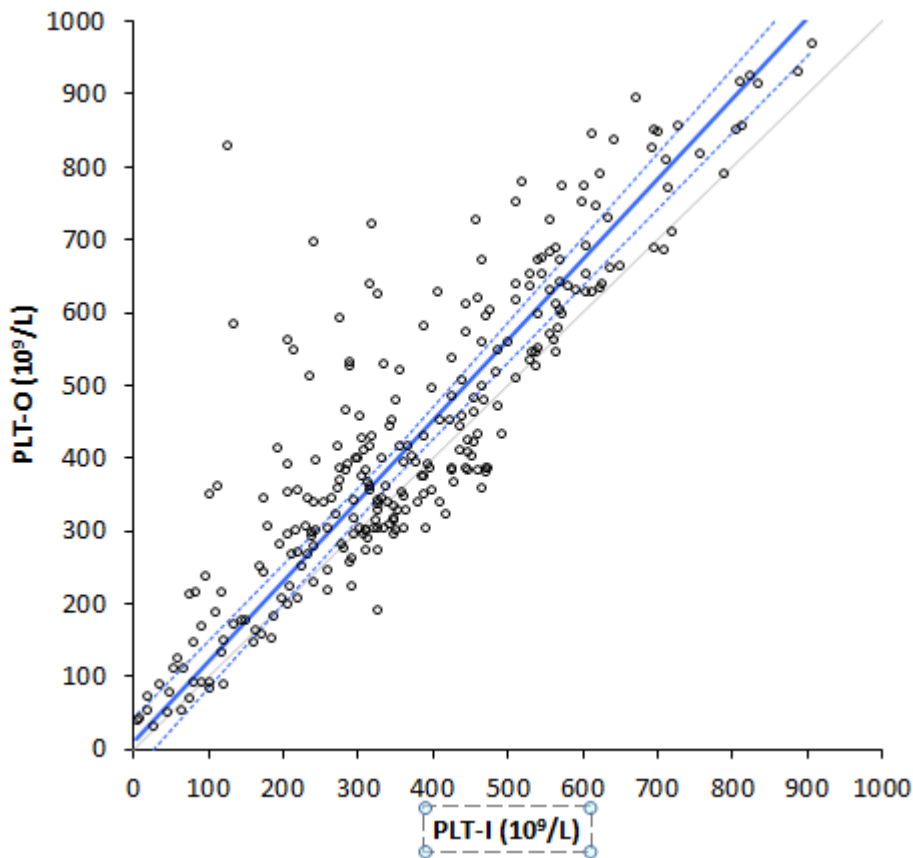
**Tableau n°6 :** Variations des numérations plaquettaires PLT-I et PLT-O ( $10^9/L$ ) en fonction de la durée de conservation.

	Temps (h)	n	Moyenne	Ecart-type	Médiane	Minimum	Maximum	% vs T0
PLTI	0	90	424,1	186,89	410,0	18	888	-
PLTO	0	90	473,2	209,60	426,0	54	931	-
PLTI	6	90	376,2	185,91	347,0	4	906	84,6
PLTO	6	90	440,4	212,29	392,0	31	971	92,0
PLTI	24	90	314,8	174,54	319,5	7	812	77,9
PLTO	24	90	394,7	200,54	352,0	43	858	82,6

#### 4.4 Comparaison des deux techniques de comptage des plaquettes

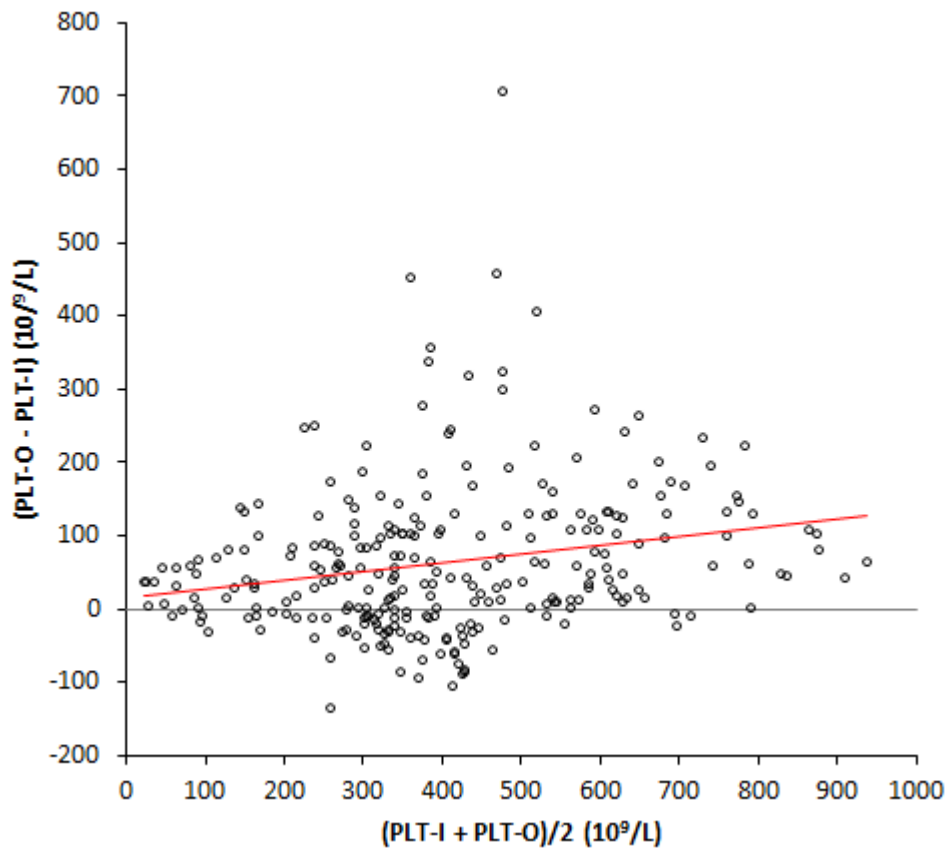
La corrélation entre les résultats des deux techniques est forte (Spearman  $r = 0,84$ ). L'équation d'agrément de Passing-Bablok :  $PLT-O = 1,10 (1,05 \text{ à } 1,16) PLT-I +$

9,1 (-11,5 à 26,0) montre un biais proportionnel de 10% en moyenne et une ordonnée à l'origine négligeable (**Figure n°4**).



**Figure n°4** : Agrément entre les numérations plaquettaires de sang de bovin par technique optique (PLT-O) ou d'impédance (PLT-I). La ligne bleue est l'équation d'agrément avec son intervalle de confiance de 95% en pointillé ; la ligne grise est la ligne d'équivalence.

La proportionnalité de la différence entre les deux techniques est confirmée par l'étude des différences. Sur le diagramme de Bland-Altman (**Figure n°5**), on peut observer une faible augmentation en fonction de la numération plaquettaire. On peut aussi observer que les différences entre les deux techniques sont parfois très intenses : seuls 37% et 57% des résultats diffèrent de moins de 10 ou 20% (en utilisant PLT-I comme référence).



**Figure n°5 :** Diagramme de différence de Bland-Altman entre les comptages plaquettaires PLT-I et PLT-O de sang de bovin. La ligne rouge représente l'évolution de la différence en fonction de la numération plaquettaire.

## 5 Discussion

L'objectif de cette thèse était de comparer l'effet de la conservation et du site de prélèvement sur la numération des plaquettes et le degré d'agrégation plaquettaire chez le bovin, à partir de sang collecté sur des tubes EDTA. Pour cela des spécimens de sang ont été prélevés sur des animaux malades hospitalisés à l'ENVT à la veine jugulaire et coccygienne, et les analyses ont été effectuées à T<sub>0h</sub>, T<sub>6h</sub> et T<sub>24h</sub>. En effet, d'après une précédente étude et des observations faites à l'ENVT, le bovin semble être une espèce prédisposée à la formation d'agrégats plaquettaires *in vitro*, ce qui peut conduire à une mauvaise interprétation des résultats hématologiques obtenus en routine [14]. Grâce à nos recherches, il a été mis en évidence que la durée de conservation influençait l'agrégation et le comptage plaquettaire *in vitro*. En revanche, le site de ponction n'influence pas ces deux variables. La corrélation entre les deux techniques de numération plaquettaire est forte, mais elles montrent des différences parfois importantes pour des mesures ponctuelles.

Tout d'abord, on a voulu voir si le site de prélèvement du sang (*i.e* veine coccygienne ou veine jugulaire) avait un effet sur l'agrégation et le comptage plaquettaire *in vitro*. De manière inattendue, aucune différence significative sur l'agrégation et le comptage plaquettaire n'a pu être mise en évidence. En effet, du fait d'un diamètre de la veine coccygienne moins important, on s'attendait à avoir un degré d'agrégation supérieur par rapport à celui obtenu à la veine jugulaire, favorisé par un écoulement plus turbulent du sang dans le tube [9]. Lors de cette étude, on a utilisé des aiguilles de diamètre important afin de réduire les turbulences induites lors du prélèvement. La ponction à la veine coccygienne peut donc être utilisée afin de réaliser un hémogramme, sans craindre de favoriser l'apparition d'amas plaquettaires. Elle est la plus largement utilisée en routine par les vétérinaires, du fait de sa praticité, ce qui rend notre résultat très intéressant.

Ensuite, on a cherché à évaluer l'impact de la durée de conservation sur le comptage et l'agrégation plaquettaire. On a pu mettre en évidence que lorsque la durée de conservation augmentait, l'Indice d'Agrégation Plaquettaire augmentait. Ces

résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de précédentes études [1, 7, 20, 32]. Pour les 2 méthodes d'analyse utilisées, on a ensuite mis en évidence que lorsque la durée de conservation augmentait, le comptage plaquettaire diminuait. Globalement, les résultats ont également montré que le comptage plaquettaire diminuait de manière significative lorsque l'IAP était supérieur à 2. L'hypothèse avancée est que le comptage plaquettaire diminue du fait de la formation des agrégats plaquettaires, ce qui est en accord avec de précédentes études menées chez le chien [1, 8, 20] et le chat [13, 16].

Le système de gradation utilisé tient compte à la fois de la taille et du nombre d'agrégats observés sur le frottis, ce qui permettrait de mieux rendre compte du degré d'agrégation d'un spécimen sanguin [29]. Cependant, on a utilisé un seuil arbitraire de 2 pour différencier les spécimens peu ou non agrégés (*i.e* IAP  $\leq 2$ ) de ceux fortement agrégés (*i.e* IAP  $> 2$ ), ce qui n'est pas très précis. En effet, alors que la numération plaquettaire diminuait de manière significative dans les spécimens fortement agrégés peu importe la technique d'analyse utilisée, les résultats n'ont pas été aussi tranchés lorsque le seuil de 2 n'était pas utilisé : seule la diminution de PLT-I entre les spécimens ayant un IAP de 4 et ceux ayant un IAP de 0 ou 1 s'est montrée significative. En outre, ce seuil n'a été utilisé que chez le chien et le chat [8, 9], ce qui ne nous a pas permis de comparer nos résultats avec de précédentes études. C'est ainsi la première fois que ce système de gradation est utilisé chez la vache, ce qui fait de notre travail une base préliminaire à l'étude de l'agrégation plaquettaire *in vitro* chez le bovin.

Afin d'éviter un biais lié au chevauchement de taille entre un agrégat plaquettaire et un globule rouge ou un globule blanc, qui fausserait la numération plaquettaire donnée par les analyseurs hématologiques, comme évoqué chez le chat [13, 16], nous avons utilisé deux techniques d'analyse différentes que nous avons comparées. On a trouvé une corrélation forte entre la méthode par variation d'impédance et la méthode optique. Cela suggère que sur un ensemble de valeurs, les résultats obtenus avec les deux techniques restent voisins avec un biais proportionnel de 10%. Cependant, comme évoqué plus haut, on a mis en évidence quelques incohérences entre les deux méthodes : la numération plaquettaire diminuait de manière significative lorsque l'IAP augmentait mais uniquement avec la méthode par variation d'impédance lorsque le seuil arbitraire n'était pas utilisé. Le diagramme de différence de Bland-Altman nous

apprend que les différences entre les 2 techniques sont parfois très intenses. Ceci peut être expliqué par le fait que les deux techniques utilisées ne reposent pas du tout sur la même technologie et donne des informations différentes sur les cellules qu'elles dénombrent. La méthode de comptage par variation d'impédance permet uniquement de différencier les cellules en fonction de leur taille. L'un des inconvénients de cette technique est la difficulté à différencier globules rouges et agrégats plaquettaires chez les espèces prédisposées à l'agrégation plaquettaire. La méthode optique, ou cytométrie de flux, permet de différencier les cellules selon leur taille mais aussi selon leur granulosité et leur densité. Les plaquettes peuvent donc en théorie être différenciées plus aisément des autres lignées cellulaires qu'avec la technique par variation d'impédance. D'ailleurs, les résultats obtenus avec le comptage optique sont toujours supérieurs à ceux obtenus par impédance, confirmant la meilleure précision du comptage optique [3, 9]. En revanche, les caractéristiques optiques d'un agrégat ne sont pas les mêmes que celles d'une plaquette seule, donc un agrégat peut ne pas être pris en compte dans la numération plaquettaire [23]. La présence d'agrégats peut donc fausser les analyses peu importe la technique utilisée, la réalisation d'un frottis sanguin reste donc indispensable afin d'évaluer le degré d'agrégation plaquettaire.

Enfin, certaines limites de notre étude peuvent être soulignées. Les analyses statistiques portant sur la composition de la population ont révélé que la majeure partie des bovins recrutés étaient des femelles, laitières, et que la plupart étaient de race Prim'Holstein. Les animaux étaient d'âges divers. On peut donc se demander si le sexe, la production, la race et l'âge des animaux recrutés peuvent avoir un impact sur le comptage et l'agrégation plaquettaire. Il a été prouvé que le type de production et l'âge, n'influençaient pas le comptage plaquettaire et l'agrégation *in vivo* [3, 14] ; on a donc supposé qu'ils n'influenceraient pas de ce fait l'agrégation *in vitro*. Aucune étude chez le bovin n'a montré d'influence de la race et du sexe sur l'agrégation plaquettaire *in vitro*, ce qui pourrait représenter un biais de notre étude. Cependant, une recherche menée chez le chat a montré une absence d'effet significatif de ces deux variables sur le comptage plaquettaire [11]. Il est également important de remarquer que la population était uniquement constituée d'animaux atteints de maladies diverses et hospitalisés à l'ENVT ce qui constitue un facteur de stress. Or il a été évoqué que le stress et certaines maladies provoquant un état inflammatoire pouvaient causer



l'apparition de plaquettes géantes (précurseurs des plaquettes), ainsi qu'une thrombocytose chez le bovin [14, 15]. La lignée plaquettaire des bovins prélevés peut donc avoir été modifiée *in vivo*, et il est possible que les comptages plaquettaires et l'agrégation mesurés *in vitro* s'en soient de ce fait trouvés modifiés. Il serait donc intéressant de prendre en compte le type de maladie dont souffrent les bovins inclus dans l'étude avant d'évaluer le degré d'agrégation plaquettaire de manière moins biaisée.

Nous avons rencontré quelques difficultés lors des manipulations effectuées pour ce travail. Le préleveur était peu expérimenté au début de la campagne de récolte des spécimens sanguins. Or il a été mis en évidence que la formation d'agrégats *in vitro* était dépendante du temps de collecte du sang et de l'expérience du manipulateur. En effet, la ponction veineuse doit être réalisée facilement sans avoir à chercher la veine [13, 21]. La collecte des spécimens sanguins n'a donc pas été réalisée dans les conditions optimales, ce qui a pu favoriser la formation d'agrégats *in vitro*. La perte des frottis sanguins pour huit animaux a diminué la taille de notre échantillon, ce qui a pu se répercuter sur les résultats obtenus. Enfin, l'étude initiale devait porter sur une comparaison entre l'EDTA et un nouvel anticoagulant, le CTAD. Or il n'a pas été possible d'obtenir des résultats pour le CTAD à cause d'un défaut d'approvisionnement en tubes. Il aurait cependant été très intéressant de tester l'efficacité du CTAD chez le bovin, car c'est un anticoagulant presque universel qui diminue le degré d'agrégation plaquettaire *in vitro* chez le chien et le chat [8, 13].

## **Conclusion**

Notre travail a permis de mettre en évidence que le site de ponction du sang prélevé sur tube EDTA chez le bovin à divers temps de conservation n'avait pas d'influence sur la numération et l'agrégation plaquettaire *in vitro*. En revanche, on a montré que la durée de conservation avait globalement tendance à diminuer la numération plaquettaire du fait de la formation d'agrégats dans le tube de prélèvement, ce qui confirme le fait que le bovin est une espèce prédisposée à la formation d'amas plaquettaires *in vitro*. Or cela peut conduire à une mauvaise interprétation des résultats d'hémogramme du fait d'erreurs dans la numération des différentes lignées cellulaires. Cela peut avoir des conséquences graves sur le diagnostic et la mise en place d'un traitement en médecine vétérinaire.

Il serait donc intéressant de recommencer notre protocole et de comparer le degré d'agrégation plaquettaire à différentes durées de conservation des spécimens sanguins. L'échantillon de population devrait être de grande taille et en bonne santé ou à minima souffrant d'une maladie n'affectant pas la lignée plaquettaire. Le sang pourrait être prélevé par un manipulateur expérimenté à la veine coccygienne sur tubes EDTA et CTAD. Les analyses devraient être faites par variation d'impédance ou par méthode optique mais toujours en corrélation avec une lecture manuelle de frottis sanguins. Ce serait la première fois que l'utilisation du CTAD comme anticoagulant serait testée chez le bovin.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, **Catherine TRUMEL**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Faure Justine** intitulée «**Comparaison des résultats d'hémogramme obtenus à partir de spécimens sanguins prélevés sur EDTA à la veine coccygienne ou jugulaire chez les bovins et plus précisément des numérations et des agrégats plaquettaires observés sur les frottis sanguins à T0h, T6h, et T24h** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 21 juin 2018  
Professeur Catherine TRUMEL  
Professeur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Isabelle CHMITELIN



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Monique COURTADE-SAÏDI



Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CFVU



Régine ANDRE-OBRECHT



## Références

- ✓ [1] ATHANASIOU L.V, POLIZOPOULOU Z, KALAFATI M.R, NTARARAS G, KONTOS V (2016) Effects of pre-analytical handling on selected canine hematological parameters evaluated by automatic analyser. *Veterinary Research Forum* ; 7 : 281 – 285.
- ✓ [2] BONDY G. S, GENTRY P. A (1987) Characterization of the normal bovine platelet aggregation response. *Camp Biochem Physiol* ; 92C (1): 67-72.
- ✓ [3] BOURGES-ABELLA N, GREFFE A, CONCORDET D, BRAUN J.P, TRUMEL C (2011) Canine reference intervals for the Sysmex XT-2000iV hematology analyser. *Vet Clin Pathol* ; 40 : 303–315.
- ✓ [4] CASONATO A, BERTOMORO A, PONTARA E, DANNHAUSE D, LAZZARO A.R, GIROLAMI A. (1994) EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gplIb-IIa. *J Clin Pathol* ; 47 : 625-630.
- ✓ [5] COLLET J.P, CHOUSSAT R, MONTALESCOT G (2004) L'agrégation plaquettaire et ses inhibiteurs dans les syndromes coronariens aigus. *M/S : médecine sciences* ; 20 : 291-297.
- ✓ [6] DE REVEL T., D. K. (2004). *Physiologie de l'hémostase. ECM-Dentisterie*, 1 : 71-81.
- ✓ [7] GOLANSKI J., PIETRUCHA T., BAI Z., GREGER J., WATALA C. (1996) Molecular insights into anticoagulant-induced spontaneous activation of platelets in whole blood-various anticoagulants are not equal. *Thromb Res* ; 83 (3): 199-216.
- ✓ [8] GRANAT F, GEFFRE A, LUCARELLI L.A, BRAUN J.P, TRUMEL C, BOURGES-ABELLA N (2017) Evaluation of CTAD (citrate–theophylline– adenosine–dipyridamole) as a universal anticoagulant in dogs. *J Vet Diag Invest* ; 29 (5): 676–682.
- ✓ [9] GRANAT F (2016a) Agrégation plaquettaire in vitro : effets anticoagulants du CTAD et utilisation à des fins diagnostiques dans les espèces sensibles. Thèse de doctorat vétérinaire, ENVT, 154 p.
- ✓ [10] GRANAT F, MONZALI C, JEUNESSE E, GUERLIN M, TRUMEL C, GEFFRE A, BOURGES-ABELLA N (2016b) Comparison of different anticoagulant associations on haemostasis and biochemical analyses in feline blood specimens. *J Feline Med Surg* ; 17: 1–9.
- ✓ [11] GRANAT F, GEFFRE A, BOURGES-ABELLA N, MORTIER J, THERON M.L, FAUCHON E, BRAUN J.P, TRUMEL C (2014) Feline reference intervals for the Sysmex XT-2000iV and the ProCyte DX haematology analysers in EDTA and CTAD blood specimens. *J Feline Med Surg* 2014 ; 16:473–482

- ✓ [12] GRANAT F, GEFFRE A, BOURGES-ABELLA N, BRAUN J.P, TRUMEL C (2013) Changes in haematology measurements with the Sysmex XT-2000iV during storage of feline blood sampled in EDTA or EDTA plus CTAD. *J Feline Med Surg* ; 15: 433– 444
- ✓ [13] GRANAT F, GEFFRE A, BRAUN J.P, TRUMEL C, (2011) Comparison of platelet clumping and complete blood count results with Sysmex XT-2000iV in feline blood sampled on EDTA or EDTA plus CTAD (citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole). *J Feline Med Surg* ; 13: 953– 958
- ✓ [14] HERMAN N, TRUMEL C, GEFFRE A, BRAUN J.P, THIBAUT M, SCHELCHER F, BOURGES-ABELLA N (2018) Hematology reference intervals for adult cows in France using the Sysmex XT-2000iV analyser. *JVDI* ; 1-10.
- ✓ [15] JONES M.L, ALLISON R.W (2007) Evaluation of the ruminant complete blood cell count. *Vet Clin Food Anim* ; 23 : 377–402.
- ✓ [16] KOPLITZ S.L, SCOTT M.A, COHN L.A (2001) Effects of platelet clumping on platelet concentrations measured by use of impedance or buffy coat analysis in dogs. *JAVMA*, 219 : 1552-1556.
- ✓ [17] LU Q, HOFFERBERT B.V, KOO G, MALINAUSKAS R.A (2013) In vitro shear stress-induced platelet activation: sensitivity of human and bovine blood. *Artificial Organs* ; 37 (10): 894–903.
- ✓ [18] MACEY M., AZAM U., McCARTHY D., WEBB L., CHAPMAN E.S, ZELMANOVIC D., NEWLAND A. (2002) Evaluation of the anticoagulants EDTA and citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (CTAD) for assessing platelet activation on the Advia 120 hematology system. *Hematology* ; 48 (6) : 891-899.
- ✓ [19] MASON R.G, READ M.S (1971) Some species differences in fibrinolysis and blood coagulation. *J Biomed Mater Res* ; 5: 121–8.
- ✓ [20] MEDAILLE C, BRIEND-MARCHAL A, BRAUN J.P (2006) Stability of selected hematology variables in canine blood kept at room temperature in EDTA for 24 and 48 hours. *Vet Clin Path* ; 35 : 18-23.
- ✓ [21] MEINKOTH J.H, ALLISON R.W (2007) Sample collection and handling : getting accurate results. *Vet Clin Small Anim* ; 37 : 203–219.
- ✓ [22] MYLONAKIS E.M, LEONTIDES L, FARMAKI R, KOSTOULAS P, KOUTINAS A.F, CHRISTOPHER M (2008) Effect of anticoagulant and storage conditions on platelet size and clumping in healthy dogs. . *J Vet Diag Invest* ; 20: 774–779.
- ✓ [23] NORMAN E.J., BARRON R.C.J, NASH A.S., CLAMPITT R.B. (2001) Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Vet Clin Pathol* ; 30 : 137-140.

- ✓ [24] PELAGALLI A, LOMBARDI P, D'ANGELO D, DELLA MORTE R, AVALLONE L, STAIANO N (2002) Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *J Comp Pathol* ; 127: 126–32.
- ✓ [25] RAO G.H, ESCOLAR G, WHITE J.R, WEISS D.J, BURRIS S, ORDINAS A, WHITE J.G (2001), Differential response of human and bovine platelets to bovine von Willebrand factor and vascular subendothelium. *Platelets* ; 12: 150–5.
- ✓ [26] SATO M, HARASAKI H (2002) Evaluation of platelet and coagulation function in different animal species using the xylum clot signature analyzer. *ASAIO J*; 48: 360–4.
- ✓ [27] SOLOVIEV M.V, OKAZAKI Y, HARASAKI H. (1999) Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. *J Surg Res* ; 82:180–7.
- ✓ [28] THIJS T, NUYTTENS B.P, DECKMYN H, BROO K (2010) Platelet physiology and antiplatelet agents. *Clin Chem Lab Med* ; 48 (Suppl 1): S3–S13.
- ✓ [29] TVEDTEN H.W, BACKLUND K., LILLIEHOOK I.E (2015) Reducing error in feline platelet enumeration by addition of Iloprost to blood specimens: comparison to prostaglandin E1 and EDTA. *Vet Clin Pathol* ; 44 (2) : 179-87.
- ✓ [30] VESSERON S, ROCHAIS Y (2012) Etat des lieux en hémostase. *IRBM News* ; 33(3) : 36-49.
- ✓ [31] WHITE J.G (1987) The secretory pathway of bovine platelets. *Blood* ; 69: 878–85.
- ✓ [32] ZANDECKI M., GENEVIEVE F., GERARD J., GODON A. (2007) Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I : Platelets. *Int J Lab Hematol* ; 29 : 21-41.
- ✓ [33] ZUCKER-FRANKLIN D, BENSON K.A, MYERS K.M (1985) Absence of a surface-connected canalicular system in bovine platelets. *Blood* ; 65: 241–4.

## Annexes

### Annexe n°1 : Descriptif de la population de bovins utilisée.

Pour chaque animal, le sexe, l'âge et la race ont été relevés, et un numéro d'étude a été attribué. Un tirage au sort a été effectué afin de déterminer quel site de prélèvement et quel type de tube seraient utilisés en premier.

Numéro d'étude	Sexe	Age	Race	Ordre de prélèvement	
				Jugulaire	CTAD
BOCE 1	Femelle	2 ans	Prim Holstein	1	2
BOCE 2	Femelle	7 ans	Montbéliarde	1	1
BOCE 3	Femelle	7 ans	Prim Holstein	2	1
BOCE 4	Femelle	7 ans	Prim Holstein	2	2
BOCE 5	Femelle	?	Prim Holstein	1	1
BOCE 6	Femelle	7 ans	Montbéliarde	2	2
BOCE 7	Femelle	7 ans	Charolaise	1	2
BOCE 8	Femelle	1,5 ans	Prim Holstein	2	2
BOCE 9	Femelle	4 ans	Blonde d'Aquitaine	2	2
BOCE 10	Femelle	16 ans	Gasconne	2	2
BOCE 11	Femelle	2 ans	Prim Holstein	2	2
BOCE 12	Femelle	11 ans	Prim Holstein	1	1
BOCE 13	Femelle	2 ans	Blonde d'Aquitaine	2	2
BOCE 14	Femelle	11 ans	Gasconne	2	1
BOCE 15	Femelle	6 ans	Blonde d'Aquitaine	1	1
BOCE 16	Femelle	5 ans	Prim Holstein	1	2
BOCE 17	Femelle	4 ans	Prim Holstein	1	1
BOCE 18	Femelle	7 ans	Prim Holstein	2	2
BOCE 19	Femelle	6 ans	Prim Holstein	2	1
BOCE 20	Femelle	6 ans	Prim Holstein	1	2
BOCE 21	Femelle	6 ans	Prim Holstein	2	2
BOCE 22	Femelle	4 ans	Prim Holstein	2	1
BOCE 23	Femelle	?	Prim Holstein	1	1
BOCE 24	Femelle	4 ans	Montbéliarde	2	1
BOCE 25	Femelle	5 ans	Prim Holstein	1	1
BOCE 26	Femelle	8 mois	Blonde d'Aquitaine	1	2
BOCE 27	Femelle	6 ans	Blonde d'Aquitaine	2	2
BOCE 28	Femelle	1 an	Prim Holstein	2	1
BOCE 29	Femelle	15 ans	Montbéliarde	1	2
BOCE 30	Femelle	4 ans	Prim Holstein	2	2
BOCE 31	Mâle	7 mois	Casta	1	1
BOCE 32	Femelle	5 ans	Prim Holstein	1	1
BOCE 33	Femelle	7 ans	Prim Holstein	1	2
BOCE 34	Femelle	5 ans	Prim Holstein	1	2
BOCE 35	Mâle	4 ans	Aubrac	1	2
BOCE 36	Femelle	4 ans	Prim Holstein	1	1
BOCE 37	Femelle	15 ans	Blonde d'Aquitaine	1	1
BOCE 38	Femelle	6 ans	Prim Holstein	1	1
BOCE 39	Femelle	6 ans	Prim Holstein	2	2
BOCE 40	Femelle	7 mois	Prim Holstein	1	1
BOCE 41	Femelle	3 ans	Prim Holstein	2	2
BOCE 42	Femelle	6 ans	Montbéliarde	1	2
BOCE 43	Femelle	5 ans	Prim Holstein	2	2
BOCE 44	Femelle	3 ans	Prim Holstein	1	1
BOCE 45	Femelle	4 ans	Prim Holstein	1	2





**Annexe n°3** : Méthode de réalisation du frottis sanguin utilisée dans ce travail.

 <p>ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE TOULOUSE</p>	<p style="text-align: center;"><b>Unité de</b> <b>Biologie Médicale Animale et Comparée</b></p> <p style="text-align: center;">ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : +33 561 193 295; mail : a.geffre@envt.fr</p>	<p style="text-align: center;"><b>Protocole</b></p>
<p style="text-align: center;"><b>Estimation de la taille moyenne des agrégats plaquettaires d'après un frottis sanguin</b></p>		

Un frottis est réalisé, toujours par le même manipulateur, à partir des prélèvements sanguins obtenus selon le protocole principal, après leur passage dans l'analyseur Sysmex XT2000iV®. L'étalement est effectué sur une lame porte objet en verre, lavée (Thermo scientific®, Menzel-Gläser, lame porte-objet prête à l'emploi, ca/env 76x26mm) sur laquelle est déposée une petite goutte de sang à l'aide d'une pipette pasteur à usage unique. Cette goutte est ensuite étalée avec une lame rodée (Menzel-Gläser®, lame à bords rodés, LRE, 50x20mm) positionnée à 45°. Le frottis est rapidement séché à l'air par agitation, sa qualité est vérifiée, une zone de lecture doit clairement être présente, puis ce dernier est directement identifié selon la nomenclature détaillée dans le protocole principal.

La coloration du frottis s'effectue de façon automatique par un automate dédié à cette fonction (Aerospray®, Hematology slide stainer-cytocentrifuge, model 7150) utilisant une coloration de type May-Grünwald-Giemsa modifiée (une combinaison d'Aerofix® additive for metahol SS-148, Reagent B Thiazin stain SS-071B, Reagent C Eosin stain SS-071C, et de buffer (pH=7.2) concentrate SS-172A).

La lecture du frottis est uniquement réalisée à la fin de l'obtention de tous les résultats concernant un spécimen donné, par le même manipulateur et sous un unique microscope standard (Nikon® eclipse E200) tout au long de la manipulation.

**Annexe n°4** : Méthode d'estimation de la taille des amas plaquettaires observés sur le frottis.

 <p>ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE TOULOUSE</p>	<p style="text-align: center;"><b>Unité de</b> <b>Biologie Médicale Animale et Comparée</b></p> <p style="text-align: center;">ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : +33 561 193 295; mail : a.geffre@envt.fr</p>	<p style="text-align: center;"><b>Protocole</b></p>
<p style="text-align: center;"><b>Estimation de la taille moyenne des agrégats plaquettaires d'après un frottis sanguin</b></p>		

Pour déterminer la taille moyenne et le nombre des amas plaquettaires présents ou non sur le frottis, le lecteur va les scorer. Il est nécessaire de regarder les frottis sur la totalité des bordures [Tvetden *et al* ; 2015] :

Grade	Nombre et taille des agrégats plaquettaires dans la queue du frottis (x1000)
0	Pas d'agrégats ;
1	<5 petits agrégats ;
2	>5 petits agrégats ou 1–2 gros agrégats ;
3	3–10 gros agrégats ;
4	>10 gros agrégats.

La taille des agrégats est évaluée de la façon suivante :

Petits : 5-20 plaquettes ;

Gros > 50 plaquettes.

## Annexe n°5 : Feuille d'analyse présentant les résultats obtenus pour chaque bovin.

Cette feuille permet de reporter les résultats de comptage plaquettaire par variation d'impédance, par cytométrie en flux et par comptage manuel après lecture du frottis sanguin. PLT-I est la numération plaquettaire variation d'impédance en  $10^3$  cellules /  $\mu$ L, PLT-O est la numération plaquettaire cytométrie en flux en  $10^3$  cellules /  $\mu$ L et AP-F est l'estimation semi-quantitative des agrégats plaquettaires d'après le frottis en nombre de plaquettes



## Feuille d'analyse

N° ETUDE : BOCE

### Résultats :

T0	PLT-I	PLT-O	AP-F
JE			
JC			
QE			
QC			

T6	PLT-I	PLT-O	AP-F
JE			
JC			
QE			
QC			

T14	PLT-I	PLT-O	AP-F
JE			
JC			
QE			
QC			

**Annexe n°6** : Données brutes regroupant les résultats de numération plaquettaire par méthode de variation d'impédance (PLT-I), optique (PLT-O), et le degré d'agrégation plaquettaire (IAP).

Les analyses ont été faites pour la veine coccygienne (Q) et jugulaire (J) et aux différents temps de conservation (0h, 6h, 24h). Les zones grisées correspondent aux frottis manquant pour 8 animaux.

N°	PLTI J0	PLTO J0	IAP J0	PLTI J6	PLTO J6	IAP J6	PLTI J24	PLTO J24	IAP J24	PLTI Q0	PLTO Q0	IAP Q0	PLTI Q6	PLTO Q6	IAP Q6	PLTI Q24	PLTO Q24	IAP Q24
1	491	435	3	445	425	2	426	386	4	459	434	0	445	408	2	394	386	4
2	454	424	3	451	404	4	409	341	3	388	351	4	306	295	4	291	224	4
3	326	342	4	347	318	4	351	303	0	322	316	0	326	305	4	310	274	4
4	241	281	2	219	272	2	96	239	4	279	277	1	225	253	4	117	216	4
5	310	301	3	302	304	3	278	283	3	309	301	3	313	292	3	291	264	3
6	330	400	4	303	375	4	231	347	4	230	307	4	238	299	4	238	294	4
7	541	673	4	529	637	4	443	613	4	573	775	4	456	728	4	318	723	4
8	696	690	4	591	632	4	424	539	4	720	711	4	604	653	4	465	561	4
9	298	402	4	244	398	4	220	357	4	121	151	4	89	170	4	79	148	4
10	269	325	4	195	282	4	74	213	4	242	301	4	167	252	4	83	216	4
11	565	690	4	326	626	4	213	550	4	545	677	4	314	639	4	206	562	4
12	108	189	4	53	111	4	57	125	4	172	245	4	73	71	4	45	51	4
13	241	230	4	196	207	4	148	178	4	220	209	4	187	184	4	133	172	4
14	567	580	1	528	535	4	486	471	4	557	570	1	510	512	4	454	463	4
15	811	919	0	728	858	4	599	753	2	671	895	1	623	792	1	511	752	2
16	303	428	4	285	392	4	206	354	4	308	411	4	274	370	4	172	345	4
17	713	772	4	634	730	4	530	653	4	711	811	0	692	826	4	618	748	4
18	302	458	4	317	430	4	272	417	4	453	482	2	170	160	3	65	113	4
19	360	394	0	357	354	3	294	343	1	309	383	0	273	360	4	327	192	4
20	531	546	4	565	546	4	538	528	4	561	562	4	572	600	4	538	547	4
21	362	330	0	343	310	0	288	257	4	80	94	3	118	133	4	124	829	4
22	399	498	3	205	392	4	112	362	4	350	481	3	192	415	3	102	350	4
23	380	340	2	340	339	4	325	337	4	327	329	2	160	147	3	91	93	2
24	297	400	4	240	340	4	210	268	4	421	454	2	385	377	2	348	297	4
25	18	74	2	4	41	4	7	43	4	35	91	4	26	31	4	18	54	4
26	835	916	2	823	927	2	806	853	4	888	931	3	906	971	3	812	858	4
27	788	791	1	757	820	4	650	664	4	696	851	3	701	848	3	602	775	4
28	435	446	4	354	418	4	330	347	3	438	458	0	370	404	1	316	357	1
29	275	388	4	263	346	4	233	270	4	315	416	4	283	385	4	254	339	4
30	346	316	1	293	319	0	215	302	3	259	305	3	133	586	4	48	80	2
31	259	247	3	207	225	4	145	179	4	259	219	2	206	200	4	163	164	4
32	293	296	4	183	154	4	120	90	4	63	54	1	100	92	4	101	84	4
33	438	508	0	409	453	1	343	446	4	467	480	2	426	485	1	344	453	4
34	352	329	3	347	334	2	321	305	3	333	304	0	360	304	0	327	275	4
35	642	838	4	556	728	4	466	672	4	612	846	1	518	781	3	405	628	4
36	459	383	3	444	386	2	418	323	3	445	384	0	428	368	1	399	358	2
37	239	697	2	275	593	3	236	514	4	288	528	3	289	533	4	282	466	4
38	604	629	3	475	605	4	334	529	4	556	684	2	459	620	1	354	522	2
39	636	663	0	579	636	0	486	550	2	611	629	3	541	600	4	484	520	4
40	426	384	4	392	393	4	337	363	4	436	411	1	388	377	2	361	348	4
41	545	653	1	569	644	1	509	618	2	604	693	0	570	673	2	510	641	3
42	470	387	1	472	386	1	377	394	4	470	381	0	465	360	1	391	304	4
43	469	597	2	444	575	3	387	581	2	555	633	0	563	612	1	499	561	1
44	709	686	1	624	635	1	540	551	1	626	641	0	569	603	0	465	500	0
45	388	431	1	312	369	3	206	295	2	366	417	0	316	361	2	179	306	2

**NOM** : FAURE

**PRENOM** : Justine

**TITRE** : Comparaison des résultats d'hémogramme obtenus à partir de spécimens sanguins prélevés sur EDTA à la veine coccygienne ou jugulaire chez les bovins et plus précisément des numérations et des agrégats plaquettaires observés sur les frottis sanguins à T<sub>0h</sub>, T<sub>6h</sub> et T<sub>24h</sub>.

**DIRECTEUR DE THESE** : Mme TRUMEL Catherine

**RESUME** : Le but de ce travail est de comparer les numérations plaquettaires et le degré d'agrégation des plaquettes en fonction de la durée de conservation et du site de ponction du sang chez le bovin. Des prélèvements ont été effectués sur tubes EDTA à la veine coccygienne et jugulaire et les analyses ont été effectuées à T<sub>0h</sub>, T<sub>6h</sub> et T<sub>24h</sub> de conservation. Il a été mis en évidence que le site de ponction n'influait pas la numération et l'agrégation plaquettaire, contrairement à la durée de conservation du sang. Il serait intéressant de tester le CTAD chez le bovin. C'est un nouvel anticoagulant limitant l'agrégation plaquettaire *in vitro* et qui permettrait ainsi d'obtenir des résultats d'hémogramme plus fiables.

**MOTS CLES** : plaquette, agrégation, durée de conservation, site de ponction, EDTA, CTAD, bovin.

---

**TITLE** : Comparison of complete blood cell count results of bovine blood samples collected on the coccygeal or jugular vein into EDTA tubes and more precisely comparison of platelet counts and aggregates observed on blood smear at T<sub>0h</sub>, T<sub>6h</sub> and T<sub>24h</sub>.

**ABSTRACT** : The aim of this study is to compare platelet count and aggregation of bovine blood, depending on the storage duration and the venepuncture site. Blood was collected using EDTA tubes on both the coccygeal and the jugular veins and the analysis were performed at T<sub>0h</sub>, T<sub>6h</sub> and T<sub>24h</sub>. These proved that, unlike the storage duration, the venepuncture site does not affect platelet count and aggregation. CTAD is a new anticoagulant known to limit *in vitro* platelet clumping, allowing for more reliable complete blood cell count results, and it would be interesting to test it on bovine blood.

**KEYWORDS** : platelet, aggregation, storage duration, venepuncture site, EDTA, CTAD, bovine.