



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 5173](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints/ID/5173)

To cite this version :

Charru, Pauline. *Comparaison de différentes associations d'anticoagulants sur les numérations plaquettaires et le formation d'agrégats chez le chat*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2011, 65 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

COMPARAISON DE DIFFÉRENTES ASSOCIATIONS D'ANTICOAGULANTS SUR LES NUMÉRATIONS PLAQUETTAIRES ET LA FORMATION D'AGRÉGATS CHEZ LE CHAT

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

CHARRU Pauline

Née, le 21 décembre 1986 à PARIS (75)

Directeur de thèse : Mme Catherine TRUMEL

JURY

PRESIDENT :

Mme Monique COURTADE-SAÏDI

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSEESSEURS :

Mme Catherine TRUMEL

Mme Nathalie BOURGES-ABELLA

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférence à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires : M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	M. DORCHIES
M. C. PAVAU	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Équidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Équidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Équine*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Équidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Élevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MAGNE Laurent**, *Urgences soins-intensifs*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **SOUBIES Sébastien**, *Microbiologie et infectiologie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Épidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
M. **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Monique COURTADE-SAÏDI,

Professeur des Universités,

Praticien hospitalier,

Histologie Embryologie,

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

Hommages respectueux.

A Madame le Professeur Catherine TRUMEL,

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie médicale des équidés et des carnivores domestiques,

Qui nous a fait l'honneur de diriger cette thèse,

Merci pour votre confiance, votre disponibilité et votre soutien

Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Nathalie BOURGES-ABELLA,

Maître de conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Histologie, Anatomie pathologique,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury de thèse

Sincères remerciements.

A Hélène, BEP, Fanny, tout le personnel du laboratoire et Cathy, ainsi que tout ceux qui ont acceptés de participer à cette étude, pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Sans vous, rien n'aurait été possible.

Merci à tous !

A mon père, pour ton soutien et ton amour inconditionnel. Merci de m'avoir permis de réaliser mes projets et de m'avoir fait confiance.

A mon frère, Côme, pour ton optimisme et ta sérénité. Je regrette que l'on ne se voie pas assez souvent. Je t'embrasse.

A Papi et Mami Mina, pour votre présence à mes cotés depuis toujours, votre aide malgré les difficultés et votre amour inconditionnel.

Merci

A Papi et Mami Bernard, pour votre soutien, votre accueil et votre courage. Pour tout l'amour que vous avez à donner.

Merci

A Carmen et Raphael pour tous ces moments passés ensemble : les débats, l'île de Ré et nos tours de jardin ou de marché et j'en passe....

A ma mère pour ce que tu m'as appris et le temps passé ensemble.

A tous mes cousins pour ces étés passés et tous nos délires

A Romain pour ton soutien indéfectible. Dans les moments difficiles et les plus beaux tu es toujours présent. Ces années avec toi ont été pour moi les plus belles. Je t'aime.

A Clémence pour ton amitié sincère et ta disponibilité à tout moment. Sans toi, ces dernières années auraient été plus difficiles. Vive le « suc' en poud' », la plus grande bouche du monde ! Merci pour tout.

A Angélique pour ces moments passés ensemble, ces pauses-café, ta confiance, tes blagues légendaires toujours bien placées, ta bonne humeur perpétuelle. Je te souhaite du bonheur dans ta vie. Tu le mérites.

A Marine et Ju' pour votre joie, votre bonne humeur et vos disputes de vieux couple. Enfin pour être mes poulottes chéries.

A Laurette, pour nos tours de la Ramée, ton courage et ta persévérance. **Marie** pour ta sensibilité, ta bonne humeur et tes pieds ! **Pauline** pour ton optimisme, ta bonne humeur. Merci ma poulette ! **Marion** pour ce rire audible de l'autre bout de la France. **Claire**, tête d'œuf, pour les tartes à la rhubarbe, les raviolis. **Mathieu** pour ton goût de la récup'. **Vincent**, pour ton goût de la photographie. **Lulu** pour tes sebbagites, tes lulages et ta bonne amitié sincère. **Evence** pour tes blagues du meilleur goût, **Benoit** pour nos discussions et ces moments partagés avec l'AFVAC

A Cam pour ces bons moments passés ensemble. **Ninoune** pour nos virées en villes et toutes ces soirées

A Marina pour ton amitié et tous tes projets. Bravo à toi et profite de ces années à venir.

A Magali et Nico, même si l'on s'est perdu de vue, j'espère que cela ne durera pas. Pour ces années de rires à n'en plus finir.

A Ragotte, Chole, Myriam, Vincent, Quentin et tous mes poulots...

Et à tous ceux que j'ai oubliés ou perdus de vue...

SOMMAIRE

<u>REMERCIEMENTS</u>	<u>5</u>
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	<u>11</u>
<u>LISTE DES ABREVIATIONS.....</u>	<u>12</u>

<u>INTRODUCTION.....</u>	<u>13</u>
---------------------------------	------------------

<u>PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</u>	<u>15</u>
--	------------------

1	La lignée plaquettaire et ses particularités chez le chat	16
1.1	Morphologie et données numériques	16
1.2	Physiologie plaquettaire	18
2	Facteurs pré-analytiques pouvant modifier la numération plaquettaire du chat	19
2.1	Conditions de réalisation du prélèvement	19
2.2	Intérêt de l'utilisation de microtubes capillaires	19
2.3	Stabilité du prélèvement	20
2.3.1	La numération plaquettaire	21
2.3.2	L'agrégation plaquettaire	21
3	Anticoagulants utilisés et effets sur la numération plaquettaire.....	22
3.1	EDTA	22
3.1.1	Pseudothrombopénie EDTA-dépendante chez l'homme	22
3.1.2	Pseudo-thrombopénie EDTA-dépendante chez le chat et autres espèces	23
3.2	CTAD	24
3.2.1	Chez l'homme	24
3.2.2	Chez le chat.....	25
3.3	Autres anticoagulants étudiés	26
3.3.1	L'héparine	26
3.3.2	La prostaglandine, PGE ₁	26
3.3.3	Des antibiotiques aux propriétés antiagrégantes : les aminoglycosides.....	26

SECONDE PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE 29

1	Objectifs	30
2	Matériel et méthodes.....	31
2.1	Critères d'inclusion des animaux	31
2.2	Préparation des animaux et réalisation des prélèvements	32
2.3	Traitement des spécimens.....	33
2.3.1	Préparation des différents spécimens antiagrégants.....	33
2.3.2	Préparation des frottis sanguin.....	34
2.4	Techniques de mesure	35
2.4.1	Numération plaquettaire automatisée, par cytométrie en flux.....	35
2.4.2	Lecture du frottis sanguin et estimation de la taille des amas plaquettaires.....	35
2.5	Analyse des données	36
3	Résultats.....	37
3.1	Valeurs retenues pour l'analyse des données	37
3.2	Comparaison des différentes mesures selon l'anticoagulant utilisé ou leur combinaison.....	38
3.2.1	Degré d'agrégation plaquettaire estimé par lecture du frottis sanguin.....	38
3.2.2	Numération plaquettaire estimée par cytométrie en flux.....	39

DISCUSSION..... 41

CONCLUSION 43

BIBLIOGRAPHIE..... 45

ANNEXES 49

Annexe 1 : Fiche d'inclusion	50
Annexe 2 : Formulaire de consentement éclairé.....	51
Annexe 3 : Protocole expérimental	52
Annexe 4 : Feuille d'analyse	58
Annexe 5 : Réalisation d'un frottis sanguin	59
Annexe 6 : Liste des animaux retenus pour l'étude	61
Annexe 7 : Résultats détaillés de l'étude.....	64

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma représentant l'ultrastructure plaquettaire	17
Figure 2 : Schéma montrant le rôle des plaquettes dans l'hémostase [4].....	18
Figure 3 : Exemple d'agrégat plaquettaire (AP) pouvant être observé sur un frottis sanguin à l'objectif à immersion x 1 000. Photo provenant du laboratoire central de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.....	21
Figure 4 : Mécanisme de l'agrégation plaquettaire EDTA-dépendante chez l'homme	23
Figure 5 : Comparaison du degré d'agrégation plaquettaire estimé à partir du frottis sanguin en fonction de l'anticoagulant utilisé.	38
Figure 6 : Comparaison des numérations plaquettares mesurées par cytométrie en flux en fonction de l'anticoagulant utilisé.	39
Figure 7 : Réalisation d'un frottis sanguin.....	59

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison du volume plaquettaire moyen (MPV) et du volume corpusculaire moyen (MCV) du chat et du chien.....	16
Tableau 2 : Grille de cotation de la taille des agrégats plaquettares d'après le nombre de plaquettes les composant [19].....	36
Tableau 3 : Grille de cotation de la taille des agrégats plaquettares d'après le nombre de plaquettes les composant [19].....	60
Tableau 4 : Numérations plaquettares obtenues par cytométrie en flux pour 46 prélèvements sanguins de chats en fonction de l'anticoagulant utilisé ($10^9/L$).....	64
Tableau 5 : Degré d'agrégation plaquettaire estimé à partir du frottis sanguin pour 46 prélèvements sanguins de chats en fonction de l'anticoagulant utilisé.....	65

LISTE DES ABREVIATIONS

ADP :	Adénosine diphosphate
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
AP :	Agrégat plaquettaire
Ca²⁺ :	Ion calcium
CLSI :	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAD :	Citrate de sodium, Théophylline, adénosine et dipyridamole
CV :	Coefficient de variation
EDCT :	Mélange d'EDTA et de CTAD
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra acétique
GP IIb/IIIa :	Glycoprotéine IIb/IIIa
MCV :	Volume corpusculaire moyen
MGG :	May-Grünwald-Giemsa
MPV :	Volume plaquettaire moyen
PAF :	Platelet-activating-factor
PGE1 :	Prostaglandine E1
TXA2 :	Thromboxane A2

INTRODUCTION

L'hémogramme fait partie du bilan de base chez un animal malade. Cependant, cet examen pose de nombreuses difficultés chez le chat, d'ordre pré-analytique et analytique. En effet, Normal et al [20] ont montré que sur 359 hémogrammes effectués chez le chat, 256 montraient une numération plaquettaire inférieure à la limite inférieure de l'intervalle de référence, alors que seulement 11 chats inclus dans l'étude montraient une réelle thrombopénie. Dans les autres cas, la numération plaquettaire faible était liée à la présence d'agrégats plaquettaires et/ou à la présence de plaquettes de grande taille [13].

Les principales difficultés pré-analytiques sont :

- La réalisation de la prise de sang qui pose des difficultés dans cette espèce particulièrement sensible au stress chez qui un prélèvement difficile se traduit souvent par la formation d'agrégats plaquettaires, voire de caillots sanguins, empêchant toute analyse.
- La nature de l'anticoagulant utilisé, qui est sujet à la controverse et qui peut avoir des conséquences sur la numération formule.
- Le temps de conservation qui peut également modifier la morphologie des cellules et leur numération.

Les difficultés analytiques sont liées aux caractéristiques tant morphologiques que physiologiques des cellules sanguines du chat :

- La proximité de taille entre les plaquettes et les hématies semble une gageure pour de nombreux analyseurs entraînant parfois une sous-estimation de la numération plaquettaire.
- La tendance exacerbée des plaquettes de chat à s'agréger entre elles est une deuxième gageure pour tous les analyseurs entraînant également une sous-estimation de la numération plaquettaire et potentiellement une surestimation des leucocytes.

Enfin, si l'on considère les conditions optimales, l'interprétation des résultats obtenus reste difficile car aucun intervalle de référence, conduit selon les recommandations internationales, n'est disponible concernant les différents paramètres de l'hémogramme dans l'espèce féline.

Cette étude a pour objectif de faire une synthèse bibliographique sur l'ensemble des difficultés d'ordre pré-analytique et analytique autour de la numération plaquettaire chez le chat. Ensuite, dans une étude expérimentale, nous souhaitons étudier l'effet de différents anticoagulants ayant fait leurs preuves en médecine humaine, et de leur association sur les numérations plaquettaires et la formation d'agrégats chez le chat.

PREMIÈRE PARTIE :

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 La lignée plaquettaire et ses particularités chez le chat

1.1 Morphologie et données numériques

Les plaquettes chez le chat sont des fragments cytoplasmiques anucléés de forme sphérique, comme chez les autres carnivores domestiques. Occasionnellement, leur forme peut être allongée ou plus grande, qualifiée de macrocytaire. Le volume moyen plaquettaire (MPV) est compris entre 11 et 18.1 fL [30] ou entre 12 et 17 fL [35]. Ces données ont été obtenues respectivement sur 25 et 48 chats adultes sains, anesthésiés avec de la kétamine. La différence de taille entre les plaquettes et les hématies (39-55 fL [4]) chez le chat est peut importante au regard de l'espèce canine (Tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison du volume plaquettaire moyen (MPV) et du volume corpusculaire moyen (MCV) du chat et du chien

	Chat	Chien
MPV (fL)	11-18.1 [30]	6.7-11.1 [18]
	12-17 [35]	3.9-6.1 [32]
MCV (fL)	39-55 [4]	60-77 [4]

Cette proximité de taille chez le chat rend difficile leur discrimination par les automates, notamment pour ceux ne s'appuyant que sur la taille pour l'identification du type cellulaire.

Aucun intervalle de référence de la numération plaquettaire n'est disponible chez le chat sain. Cependant, une étude datant de 1984 réalisée sur 25 chats sains a établi des valeurs usuelles allant de $296.10^9/L$ à $850.10^9/L$ [30]. Lors d'un état de stress, comme la réalisation d'une prise de sang, on observe chez le chat une splénocontraction qui entraîne une augmentation de la quantité de plaquettes circulantes du fait de l'importante réserve splénique dans cette espèce [4].

Sur un frottis sanguin coloré avec une coloration de type Romanovsky (comme le May-Grünwald-Giemsa ou MGG), les plaquettes sont de petits corps sphériques avec un centre de couleur pourpre composé de granules et d'un corps bleu pâle. Les plaquettes félines ont tendance à s'agréger facilement. Il n'est pas rare de voir ces dernières se rassembler en une masse amorphe nommée agrégat plaquettaire (AP) [4]. La conséquence est une sous-estimation de la numération plaquettaire par les automates d'hématologie.

Les plaquettes ont une structure très spécifique et complexe leur permettant de jouer une fonction clé dans l'hémostase. Le réseau membranaire des plaquettes joue un rôle fondamental dans

leurs fonctions d'adhésion et de coagulation. On distingue une membrane plasmique, un glycocalyx (la partie externe de protéines transmembranaires complexes : intégrines, immunoglobulines, lectines et sélectines) et un grand nombre d'invaginations, constituant un système canaliculaire ouvert (figure 1).

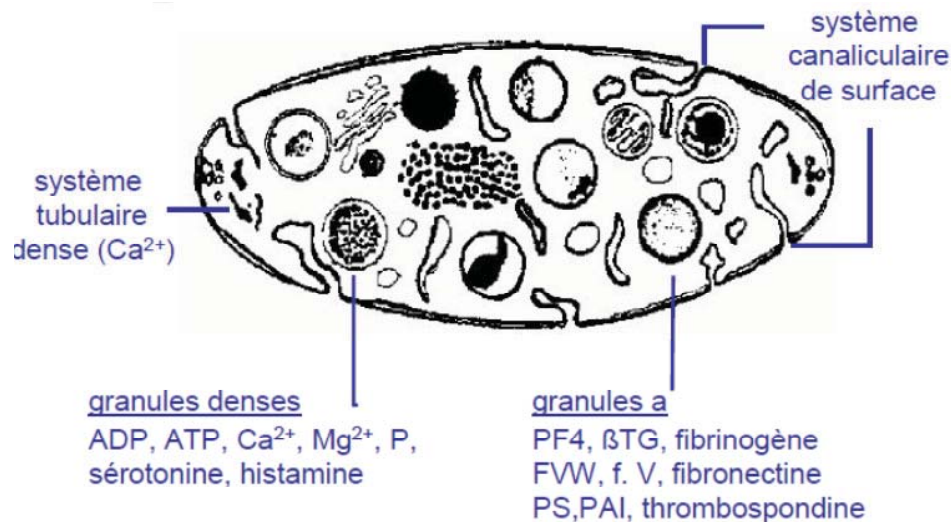


Figure 1 : Schéma représentant l'ultrastructure plaquettaire

Parmi les intégrines les plus impliquées dans les fonctions d'adhésion et d'agrégation plaquettaire, on retrouve la glycoprotéine GP IIb/IIIa. C'est l'intégrine la plus représentée au sein de la membrane plasmique des plaquettes, que ce soit à leur surface ou au niveau du système canaliculaire et des différents granules (α et denses). GP IIb/IIIa interagit surtout avec le fibrinogène, le facteur de Willebrand, la fibronectine et la vitronectine. Cette protéine change de conformation lors de l'activation des plaquettes par la thrombine ou l'ADP, par exemple. Ainsi, son affinité pour ses ligands augmente, notamment vis-à-vis du fibrinogène. Suite à leur liaison avec leurs ligands, une cascade de signaux se met en place au sein de la plaquette entraînant :

- Le relargage d'ions Ca^{2+} à partir du réseau tubulaire dense
- Un changement de forme des plaquettes (passant par une forme discoïde à une forme sphérique plus ou moins associée à des pseudopodes),
- Le relargage des granules
- Des changements membranaires.

Toutes ces étapes aboutissent à la formation d'agrégats plaquettaire. Des récepteurs aux agonistes de l'activation plaquettaire (la thrombine et l'ADP) sont aussi présents à la surface des plaquettes.

1.2 Physiologie plaquettaire

Lors de l'hémostase, les plaquettes interagissent avec les cellules endothéliales endommagées. Une plaquette va adhérer à leur surface, s'activer puis recruter d'autres plaquettes en les activant pour former un agrégat plaquettaire. Dans un premier temps, les plaquettes subissent un changement conformationnel entraînant l'activation des intégrines GP IIb/IIIa permettant aux plaquettes d'adhérer aux facteurs de Willebrand et au fibrinogène. Les plaquettes s'activent et prennent alors leur forme sphérique plus ou moins associée à des pseudopodes.

Ensuite, les plaquettes sécrètent le contenu de leur granules, dont certains éléments sont des agonistes de l'agrégation plaquettaire, comme l'ADP, la sérotonine, l'adrénaline et des molécules synthétisées lors de l'activation plaquettaire comme le PAF (platelet-activating-factor), le thromboxane (TXA₂), mais aussi la thrombine et le collagène [4].

Tous les signaux qui composent les différentes étapes précédemment citées vont permettre l'agrégation plaquettaire. Deux voies mises en jeu : la voie du métabolisme des acides arachidoniques et celle des granules denses. Mais pour cela, certains facteurs sont indispensables, comme les ions Ca²⁺.

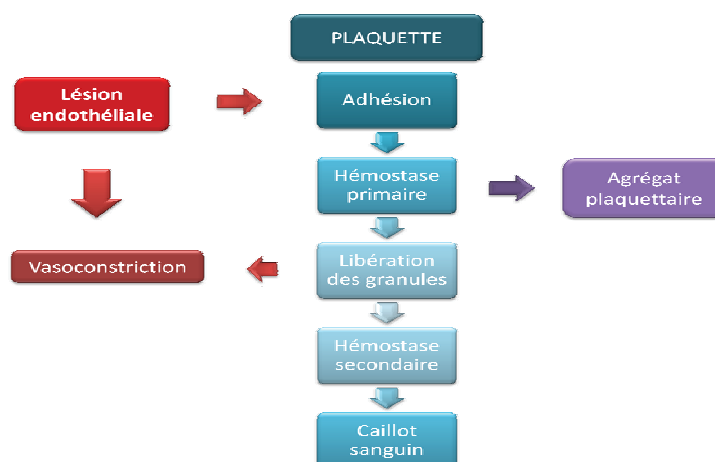


Figure 2 : Schéma montrant le rôle des plaquettes dans l'hémostase [4]

2 Facteurs pré-analytiques pouvant modifier la numération plaquettaire du chat

2.1 Conditions de réalisation du prélèvement

Le chat est sujet à la formation d'agrégats plaquettaires *in vivo* ou *in vitro* lorsqu'il se trouve en situation de stress, comme lors de la réalisation de prélèvement sanguin. En effet, chez certains chats, il semble que les plaquettes soient plus réactives face à des taux élevés de sérotonine, d'adrénaline ou d'autres substances dans le sang. Il est donc recommandé de se conformer aux bonnes pratiques afin de limiter le stress de l'animal permettant de ce fait de limiter l'activation plaquettaire.

Tout d'abord, la contention de l'animal doit être minimale et réalisée dans le plus grand calme ; le but étant de ne pas le stresser et de pouvoir réaliser une prise de sang atraumatique [17]. Le site de ponction à privilégier est la jugulaire car l'utilisation de vaisseaux dont le flux et le diamètre sont plus faibles (comme les céphaliques) favorise l'agrégation plaquettaire. Les vaisseaux déjà traumatisés sont bien sûr à proscrire [13].

L'utilisation d'une crème anesthésique (prilocaine/lidocaïne) avant la prise de sang a montré son intérêt dans de nombreuses études ([5] et [6]). L'efficacité de cette crème a été démontrée lors de la réalisation de prises de sang chez l'adulte et l'enfant et de ponctions lombaires chez l'enfant [34]. Une efficacité similaire a été observée chez le rat et chez les carnivores domestiques [5]. Peu d'effets secondaires sont rapportés [6]. Une étude réalisée sur 10 chats a montré l'absence d'effets indésirables locaux secondaires à l'utilisation de ces principes actifs ou des excipients associés. Aucun des niveaux plasmatiques détectables d'anesthésique n'a pu être mesuré 6 heures après l'application de cette crème, ce qui laisse penser qu'il n'y aurait aucune résorption systémique significative. Il est recommandé de déposer la crème sur une peau saine au minimum 1 heure avant la réalisation de l'acte douloureux [5].

2.2 Intérêt de l'utilisation de microtubes capillaires

Le matériel à utiliser pour la réalisation de prélèvement sanguin est également important à considérer. Il est conseillé d'éviter les aiguilles de faible diamètre ainsi que les prélèvements sous pression négative, à l'aide d'une seringue [22]. Par ailleurs, il est préférable d'utiliser des tubes en silicone ou en plastique et non en verre [15]. Dans l'idéal, il est également préconisé de se débarrasser

des premières gouttes de sang collectées, riches en plaquettes activées, pouvant induire des agrégats plaquettaires en choisissant de déposer ce sang sur tube sec, par exemple, qui sera utilisé pour des analyses biochimiques ou sérologiques [15]. Il est aussi recommandé de remplir correctement les tubes utilisés, comme préconisé par le fabricant, pour que l'action de l'anticoagulant présent dans le tube soit optimale.

La limite d'utilisation des tubes de prélèvement pour les analyses hématologiques est leur volume important (2 à 3 mL au minimum). L'utilisation de microtubes capillaires limite les volumes entre 200 et 500 μ L de sang par prélèvement. De plus, malgré les risques d'activation plaquettaire, les prélèvements réalisés au niveau des veines céphaliques ou saphènes sont mieux tolérés par les chats. Une étude réalisée en 2007 sur 6 chats [23] a montré que l'utilisation de systèmes capillaires semble être moins invasive, plus rapide et plus sûre, en particulier sur des chats dont des prélèvements répétés sont nécessaires. Aucune différence significative n'a été relevée vis-à-vis du stress engendré par la ponction. Cependant, même si l'utilisation de microtubes capillaires présente des avantages indiscutables lors d'une analyse biochimique, son utilisation lors d'analyse hématologique est plus discutable. En pratique (résultats non publiés), la formation d'agrégats plaquettaires semble plus fréquente sur microtubes capillaires que pour un tube classique.

Ainsi, dans chaque situation, il convient de définir soigneusement la méthode à utiliser. Il existe de nombreuses recommandations mais aucune n'est idéale : suivre ces recommandations permet seulement de limiter le risque de formation d'agrégats plaquettaires.

2.3 Stabilité du prélèvement

Il semble logique de réaliser les analyses hématologiques le plus rapidement possible après le prélèvement. En pratique, il y a souvent un délai entre le prélèvement et l'analyse de l'échantillon car tous les vétérinaires ne sont pas pourvus en matériel permettant la réalisation des analyses sur place.

Plusieurs études ont essayé d'étudier l'influence du stockage (température et durée de conservation) sur les populations plaquettaires notamment [16].

2.3.1 *La numération plaquettaire*

L'évolution de la numération plaquettaire lors de la conservation des prélèvements a été peu étudiée [1]. Le nombre de plaquettes semble avoir tendance à diminuer au cours de la conservation du prélèvement chez le chat, notamment au bout de 24 heures [1] d'après des mesures effectuées avec un automate à variation d'impédance.

Il est rapporté par un auteur que la numération plaquettaire est généralement stable après 5 heures de conservation à température ambiante, et après 24 heures à 4°C [26]. La morphologie plaquettaire semble elle aussi stable dans les 24 premières heures suivant le prélèvement.

2.3.2 *L'agrégation plaquettaire*

Une étude a comparé la prévalence des thrombopénies chez le chat en utilisant des échantillons sanguins provenant de leur structure et d'autres confrères. Au cours de leur étude, aucune différence significative sur le degré d'agrégation plaquettaire selon la provenance des spécimens n'a pu être mise en évidence [20].

De légères modifications de la courbe de distribution des plaquettes après analyse différée par un automate à variation d'impédance feraient penser à la formation d'agrégats plaquettaires [1], d'après une thèse non publiée.

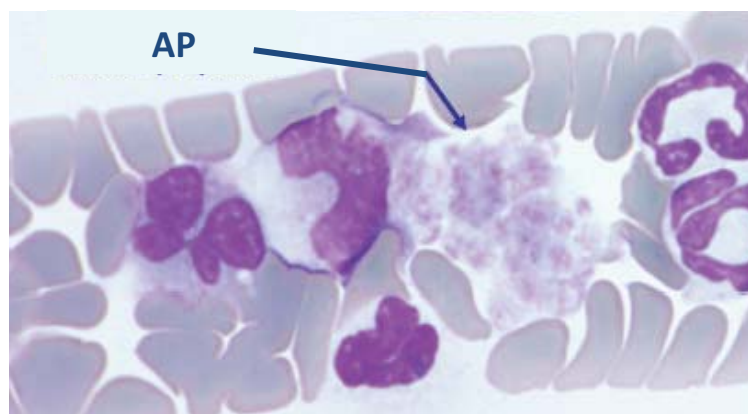


Figure 3 : Exemple d'agrégat plaquettaire (AP) pouvant être observé sur un frottis sanguin à l'objectif à immersion x 1 000. Photo provenant du laboratoire central de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

3 Anticoagulants utilisés et effets sur la numération plaquettaire

Différents anticoagulants sont utilisés en hématologie pour la réalisation d'une numération formule et semblent avoir des propriétés antiagrégantes variables.

3.1 EDTA

3.1.1 *Pseudothrombopénie EDTA-dépendante chez l'homme*

L'EDTA, ou acide tétra-acétique éthylène diamine, est de nos jours couramment utilisé chez l'homme et les animaux domestiques pour la réalisation d'héмоgrammes [12]. Il est en effet recommandé par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) pour le comptage de cellules sanguines et la réalisation de formules leucocytaires [24]. Pourtant, il a été démontré chez l'homme, dans certains cas une numération plaquettaire erronée liée à l'utilisation de cet anticoagulant. On parle de pseudo-thrombopénie EDTA-dépendante. La prévalence de ce phénomène est estimée entre 0.07 à 0.20%.

La pseudothrombopénie EDTA-dépendante engendrerait la formation d'agrégats plaquettaires et parfois un satellisme des plaquettes autour des leucocytes, phénomène moins connu. Le mécanisme incriminé implique des auto-anticorps circulant entraînant une agglutination plaquettaire. L'activation de ces auto-anticorps entraîne l'exposition d'épitopes de la glycoprotéine GP IIb-IIIa (récepteur du fibrinogène) [2].

Chez l'homme, ce phénomène semble survenir dans les quelques minutes suivant la prise de sang.

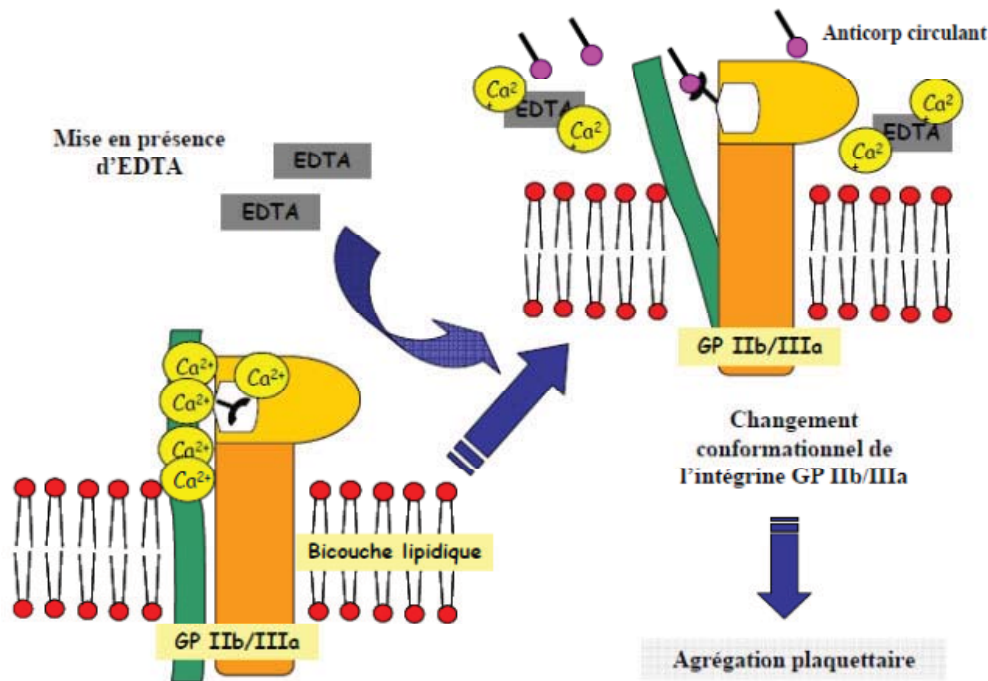


Figure 4 : Mécanisme de l'agrégation plaquettaire EDTA-dépendante chez l'homme

3.1.2 Pseudo-thrombopénie EDTA-dépendante chez le chat et autres espèces

La pseudothrombopénie EDTA-dépendante a été démontrée chez le cheval [9] et notée chez le chien (un seul cas rapporté) [33]. Un phénomène similaire semble être présent chez le chat. Près de 50% des échantillons sanguins de chat prélevés sur EDTA présentent une réduction artéfactuelle légère à modérée de la numération plaquettaire [13], sans pour autant savoir si c'est l'EDTA qui en est responsable.

Une étude utilisant l'EDTA comme anticoagulant a évalué la prévalence des thrombopénies vraies chez le chat à 3.1 %, alors que 71 % (256/359) des chats inclus dans l'étude présentait une numération plaquettaire inférieure aux valeurs usuelles de l'espèce [20].

Par contre, le mécanisme immunologique suspecté n'a pas été confirmé en médecine vétérinaire. Chez le chat, on considère que ce phénomène surviendrait rapidement mais de façon variable selon les individus : environ 6 heures après le prélèvement, lors du stockage [13].

3.2 CTAD

Le citrate de sodium est un anticoagulant très étudié, car très controversé. Il constitue l'anticoagulant de référence chez l'homme et les animaux domestiques pour la réalisation de tests fonctionnels des plaquettes et l'exploration de la coagulation mais aussi pour les prélèvements destinés à des transfusions, étant donné sa faible toxicité [26]. Mais les résultats aléatoires obtenus selon les différentes études [19] tendent à ajouter au citrate d'autres inhibiteurs spécifiques de l'activation plaquettaire.

Le CTAD, mélange de citrate de sodium, théophylline, adénosine et dipyridamole, a été dans un premier temps étudié et développé pour la médecine humaine. Il est aujourd'hui utilisé pour l'estimation de la numération plaquettaire. Il est commercialisé, sous le nom de Diatube-H® (Becton-Dickinson), et contient 0.109 mmol de citrate de sodium et acide citrique, 15 mmol de théophylline, 3.7 mmol d'adénosine et 0.198 mmol de dipyridamole à un pH de l'ordre de 5.

3.2.1 Chez l'homme

Chez l'homme, les composants de cette association d'anticoagulants entraînent une inhibition de l'adhésion, de l'agrégation et du relargage des granules des plaquettes. L'activation des plaquettes est inhibée [29].

Diverses études réalisées chez l'homme ont montré que les prélèvements réalisés sur CTAD présentaient une plus faible activation des plaquettes *in vitro* que ceux prélevés sur EDTA par diminution de l'expression de glycoprotéines révélatrices de l'état d'activation des plaquettes [12]. Dans ces études, un mélange d'EDTA et de CTAD maintenu à température ambiante a également été étudié, et semble avoir un effet inhibiteur supérieur sur l'activation plaquettaire que le CTAD seul. Malgré tout, aucune différence significative sur la numération plaquettaire n'a été mesurée par un automate (ADVIA 120®, Siemens) au sein de prélèvements sanguins collectés sur CTAD par rapport à des prélèvements collectés sur EDTA [12].

3.2.2 Chez le chat

Chez le chat, une étude publiée en 2001 [18] a montré que l'utilisation du CTAD permet d'obtenir des numérations plaquettaires et leucocytaires par variation d'impédance plus fiables que l'EDTA, ou encore le citrate de sodium. Le CTAD a réduit la formation d'agrégats plaquettaires, objectivée par lecture de frottis sanguin, pour 88% des 51 prélèvements sanguins de chats étudiés. Dans cette même étude, il est rapporté que le CTAD a une supériorité d'efficacité vis-à-vis du citrate de sodium. Ainsi, l'utilisation du CTAD permettrait d'éviter le sur-diagnostic des thrombopénies chez le chat. En effet, selon l'étude de Norman et al [19], près d'un tiers des chats présentaient une numération plaquettaire inférieure à $100.10^9/L$ sur EDTA (soit 16), contre seulement 1 sur CTAD.

Un travail de thèse de 2009 [7] a démontré que l'utilisation de l'association d'anticoagulant EDTA et CTAD chez le chat permet de réduire la formation d'amas plaquettaires (résultats non publiés). Cette étude, réalisée à partir de sang prélevés sur EDTA dans le cadre de l'activité de routine, n'a pas permis de comparer l'effet du CTAD seul.

Les mécanismes expliquant l'inactivation plaquettaire et la limitation de la formation d'agrégats plaquettaires lors de prélèvements sur CTAD ne semblent pas identiques à ceux rencontrés chez l'homme. Chez l'homme, l'efficacité du CTAD est en partie expliquée par la simple augmentation de la concentration en AMP_c qui évite la formation d'agrégats plaquettaires ADP-dépendants. Au contraire chez le chat, la concentration en adénosine semble plus importante pour limiter la formation d'agrégats par inactivation de la composante sérotonine-dépendante de l'activation plaquettaire [28]. Par contre, le dipyridamole, qui chez l'homme empêche la dégradation de l' AMP_c , ne permet pas, à la concentration utilisée dans les tubes commercialisés, de limiter l'agrégation plaquettaire ADP-dépendante chez le chat [21]. Quant à la théophylline, celle-ci potentialiserait chez le chat l'activité désagrégante d'une prostaglandine [19], mais ne permettrait pas à elle seule d'inhiber l'activation plaquettaire [8]. Le CTAD semble donc limiter l'activation plaquettaire et par conséquent la formation d'agrégats plaquettaires chez le chat, mais ne les élimine pas complètement.

3.3 Autres anticoagulants étudiés

3.3.1 *L'héparine*

L'héparine est aussi un anticoagulant très controversé vis-à-vis de l'agrégation plaquettaire. En 1987, il a été montré chez l'homme que l'héparine n'entraîne aucune différence significative par rapport à l'EDTA concernant la numération plaquettaire [14]. Chez l'homme, des patients prétraités avec de l'héparine ont montré des numérations plaquettaires supérieures et une diminution de la quantité d'agrégats plaquettaires sur les prélèvements réalisés sur héparine et non sur EDTA.

Actuellement, l'héparine est un anticoagulant utilisé pour des tests spécifiques comme les analyses de gaz sanguins, mais n'est pas utilisée en hématologie.

3.3.2 *La prostaglandine, PGE₁*

La PGE₁ est un inhibiteur des fonctions plaquettaires chez l'homme [3]. Par contre ses fonctions inhibitrices en font un agent à écarter pour l'étude fonctionnelle des plaquettes.

Chez le chat, les prostaglandines permettent une désagrégation des amas plaquettaires dans les 3 heures suivant leur formation [8]. L'étude de Welles et al de 1994 [31] a montré que PGE₁ permettait de diminuer l'activation des plaquettes.

3.3.3 *Des antibiotiques aux propriétés antiagrégantes : les aminoglycosides*

Chez l'homme, Sakurai *et al* [25] ont montré que l'addition d'antibiotiques, et plus précisément d'aminoglycosides comme la kanamycine, à un tube prélevé sur EDTA permet d'induire la dissociation des agrégats plaquettaires présents lors de la thrombopénie EDTA-dépendante. Dans cette étude [25,] après examen du frottis sanguin, il semble que seuls les prélèvements supplémentés en kanamycine ne présentent aucune altération morphologique des cellules.

Chez le chat, la supplémentation en kanamycine a également été étudiée. Une étude de 2009 [7] n'a pas montré d'amélioration des numérations plaquettaires lorsque l'on ajoute ou non de la kanamycine à un prélèvement réalisé sur l'association EDTA et CTAD.

SECONDE PARTIE :

ETUDE EXPERIMENTALE

1 Objectifs

Comme nous l'avons dit, il est très difficile chez le chat d'obtenir une numération plaquettaire fiable en raison de la grande sensibilité de cette espèce à l'agrégation plaquettaire et de la taille des plaquettes. L'objectif de cette étude a été de comparer les effets de divers anticoagulants sur microtubes capillaires sur la numération plaquettaire et la formation d'agrégats chez le chat.

L'analyse de la littérature effectuée précédemment a montré que chez le chat :

- Le CTAD réduisait l'agrégation plaquettaire mais ne pouvait pas l'éliminer totalement [19], comme cela avait déjà été démontré chez l'homme [12].
- L'utilisation d'une association d'EDTA et de CTAD permettait de réduire la formation d'agrégats (données non publiées) [7], comme cela avait été observé chez l'homme [12].

Par conséquent, il a été décidé de comparer les effets antiagrégants plaquettaires de l'EDTA, du CTAD et de l'association EDTA et CTAD. L'utilisation de microtubes capillaires permettant des prélèvements de petits volumes sanguins (entre 200 et 500 μ L par tube) a permis de comparer, pour chaque chat inclus dans l'étude, les 3 anticoagulants. Nous avons étudié pour chaque prélèvement la présence d'agrégats plaquettaires et les effets des différents anti-agrégants sur les comptages plaquettaires.

Pour des raisons d'éthique et afin de minimiser tout effet pré-analytique et de nous focaliser sur l'aspect analytique, notre étude a porté sur des chats cliniquement sains prélevés dans des situations de stress réduit.

Pour évaluer l'agrégation plaquettaire et son effet sur la numération plaquettaire dans les différents spécimens, les méthodes utilisées ont été :

- L'observation et la quantification des agrégats plaquettaires sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG) selon la méthode décrite par Norman en 2001 [19].
- Des numérations plaquettaires avec un analyseur Sysmex XT2000iV® par simple passage par cytométrie en flux.

2 Matériel et méthodes

2.1 Critères d'inclusion des animaux

Afin de ne recruter que des animaux sains sans affection connue et de plus de 6 mois, nous avons prélevé des chats appartenant aux étudiants de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, désirant effectuer un dépistage FIV/FelV, un typage du groupe sanguin ou une évaluation biochimique. Des rendez-vous étaient fixés à l'avance pour limiter le temps d'attente avant le prélèvement et de façon à ce qu'aucun des chats inclus dans l'étude ne se croisent (Annexe 6). Tous les propriétaires ont signé un consentement éclairé (Annexe 2) après complète information sur le protocole utilisé (Annexe 3). Les critères d'exclusion ont été :

- Une anomalie à l'examen clinique
- L'impossibilité de préparer le chat avant le prélèvement
- La présence de tubes contenant un volume de sang insuffisant ou trop important
- La présence de tubes contenant un caillot sanguin macroscopique

Le but a été d'inclure assez de chats afin d'obtenir 40 animaux dont les résultats puissent être interprétables [10], en tenant compte des possibles erreurs analytiques ou autres difficultés, entre octobre 2009 et février 2010.

Chaque chat s'est vu attribué une feuille d'accompagnement (associée à un numéro d'identification) pour l'étude (Annexe 1) sur laquelle ont été reporté le nom du propriétaire, le nom du chat ainsi que toutes les données nécessaires à l'inclusion de l'animal. Le numéro d'étude a permis de traiter les données de façon anonyme (Annexe 4).

2.2 Préparation des animaux et réalisation des prélèvements

La veille du rendez-vous, au domicile du propriétaire, les chats ont été tondu sur un carré d'environ 2 cm de long sur 1.5 cm de large en regard des 2 veines céphaliques au milieu des membres thoraciques à l'aide d'une tondeuse silencieuse adaptée aux chats. Si la tonte était impossible, les chats ont été exclus de l'étude.

Dans l'heure précédant le rendez-vous, au domicile du propriétaire, une crème anesthésique locale (Crème EMLA®, composée de 2.5% de lidocaïne et de 2.5% de prilocaïne, Astra Zeneca, Wilmington DE, USA) a été déposée sur les zones de tonte par le propriétaire. Comme nous l'avons vu, il est rapporté dans la littérature que le délai optimal permettant à la crème de faire effet est d'une heure [6]. Aucun système protecteur n'a été déposé sur les antérieurs afin de limiter le stress de l'animal.

Les animaux ont été transportés jusqu'au lieu de rendez-vous dans leur boîte de transport. Si besoin un système de sécurisation à l'aide de Feliway® (solution à vaporiser composée de 10% de la fraction F3 d'analogue structural de phéromones faciale du chat ; Feliway® CEVA Santé Animale, Libourne, France) a été utilisé [11]. Dans ce cas, 30 minutes avant l'introduction du chat dans sa boîte de transport, le propriétaire a effectué une pulvérisation aux 4 coins de la cage ainsi que 2 pulvérisations au sol et au plafond.

La gestion du planning a permis une attente nulle avant le prélèvement. Chaque chat a été examiné par le même manipulateur dans une salle adaptée et calme. Un clinique complet a alors été réalisé (Annexe 1).

Les prises de sang et la contention des chats ont été réalisés par les 2 mêmes personnes avec l'aide du propriétaire si besoin. Une aiguille 25 G x 5/8" (Aiguille stérile Orange 0.5 mm-16 mm, BD Microlance 3, Drogheda, Ireland) a été introduite dans la veine céphalique afin de procéder au prélèvement.

Des scores évaluant la difficulté de la contention et du prélèvement ont été attribués à chaque animal. Les notes allaient de 1 à 5. Pour la contention, la valeur 1 a été attribuée aux chats qui ont accepté une contention minimale. La note de 5 a été attribuée aux chats dont la contention a nécessité le plus précaution (intervention du propriétaire, prise par la peau du cou...). Pour le prélèvement, la note de 1 a été attribuée aux chats dont le prélèvement a été réalisé dans difficulté (une seule ponction nécessaire, remplissage rapide des capillaires...). La note de 5 a été attribuée à un prélèvement réalisé avec difficulté (plusieurs ponctions veineuses nécessaires, flux sanguin lent, coagulation précoce dans l'aiguille...).

Pour chaque chat, les 3 prélèvements (EDTA, CTAD et EDTA+CTAD ou EDCT) étaient effectués dans un ordre aléatoire, déterminé à l'avance par un même manipulateur et randomisé à l'aide du tableur Excel®. Après le prélèvement, les tubes ont été immédiatement homogénéisés par 10 retournements lents. Chaque tube a été identifié selon une nomenclature précise, CTxEDTA, CTxCTAD et CTxEDCT, x étant le numéro d'étude du chat. L'heure de prélèvement a été notée sur la fiche d'accompagnement du chat (Annexe 4).

2.3 Traitement des spécimens

2.3.1 Préparation des différents spécimens antiagrégants

Les 3 tubes différents étaient préparés par le même manipulateur dans la demi-heure précédant le prélèvement :

- Un minitube collecteur de 200 µL contenant de l'EDTA (EDTA 200 µL, Minicollect®, Sarstedt), identifié pour chaque chat « CTxEDTA »
- Un minitube sec de 500 µL (500 µL, Minicollect®, Greiner-bio-one) dans lequel 50 µL de CTAD ont été ajoutés, identifié « CTxCTAD »
- Un minitube EDTA (EDTA 200 µL, Microvette®, Sarstedt) dans lequel 20 µL de CTAD ont été ajoutés, identifié « CTxEDCT »

Une fois les 3 tubes correctement remplis, tous les spécimens étaient placés pendant 20 minutes sur un agitateur (Speci Mix®, Oxford, CT06478 USA). Les analyses étaient faites de la même façon pour chaque tube EDTA, CTAD et EDCT.

2.3.2 Préparation des frottis sanguin

Un frottis sanguin était réalisé pour chaque tube toujours par le même manipulateur selon le même protocole (Annexe 3). L'étalement était effectué sur une lame porte-objet en verre (Lame porte-objet prête à l'emploi®, ca/env 76 x 26 mm, Thermo Scientific Saarbrückener, Manzel-Gläser) sur laquelle était déposée une petite goutte de sang à l'aide d'une pipette Pasteur à usage unique. Cette goutte était étalée à l'aide d'une lame rodée (Lame à bords rodés®, LRE, 50 x 20 mm, Thermo Scientific Saarbrückener, Manzel-Gläser) positionnée à 45°. Le frottis était rapidement séché à l'air par agitation et sa qualité était vérifiée visuellement. Une zone de lecture devait être clairement présente. Puis ce dernier était directement identifié selon la nomenclature prédéfinie.

La coloration du frottis était effectuée par un automate dédié à cette fonction (Aerospray®, Hematology slide stainer-cytoventrifuge, model 7150, Wescor), utilisant une coloration de type May-Grünwald-Giemsa modifiée (combinaison d'Aerofix® additive for metahol SS-148, Reagent B Thiazin stain SS-071B, Reagent C Eosin stain SS-071C, et de Buffer concentrate (pH = 7.2) SS-172A). Une fois coloré, les frottis ont été fixés (LMR-Sol®, solvant spécial 5L, Labo-moderne, Paris), montés entre lame et lamelles (Lame couvre-objet 24 x 60 mm®, Thermo Scientific Saarbrückener, Menzel-Gläzer) à l'aide d'une colle adaptée (LMR-histolaque 1L®, laque transparente à séchage rapide, Labo-moderne, Paris), puis stockés dans une boîte à l'abri de la lumière.

La lecture des frottis a été réalisée uniquement après l'obtention de tous les résultats concernant l'échantillon donné, par le même manipulateur.

2.4 Techniques de mesure

2.4.1 *Numération plaquettaire automatisée, par cytométrie en flux*

Les comptages automatiques de plaquettes étaient réalisés par le Sysmex XT2000iV® (Sysmex) par simple passage par cytométrie en flux.

Préalablement, aux analyses, le Sysmex XT2000iV® était contrôlé tous les jours par des techniciennes selon le protocole de routine du laboratoire : si une (ou plusieurs) des mesures de contrôle étai(en)t en dehors des cibles fournies par le fabricant, les diverses opérations correctrices prévues par le fabricant sont mises en œuvre pour s'assurer du bon fonctionnement des mesures jusqu'à résolution du problème et obtention des résultats de contrôles dans les cibles. Dans une étude antérieure réalisée au sein du laboratoire, l'imprécision du Sysmex XT2000iV® a été évaluée selon la recommandation du CLSI : le coefficient de variation (CV) de l'imprécision inter-essai était de 6%.

Chaque échantillon est analysé après 30 retournements lents. L'heure d'analyse et les résultats obtenus par cytométrie en flux sont notés sur la feuille d'analyse du chat (Annexe 4).

2.4.2 *Lecture du frottis sanguin et estimation de la taille des amas plaquettaires*

Les frottis sanguins étaient tous lu en même temps par le même manipulateur à l'aide d'un unique microscope (oculaire BX60 WH10X/22®, Olympus, Japan).

Dans un premier temps, une observation grossière du frottis était réalisée à plus faible grossissement, x 100, soit à l'aide de l'objectif 10 (Objectif UPlanFl x 10/0.30, Olympus, Japan) puis x 200, soit à l'aide de l'objectif 20 (Objectif UPlanFl x 20/0.50, Olympus, Japan). L'examen portait préférentiellement sur les bords du frottis, et notamment la queue du frottis, afin de prendre connaissance de l'existence ou l'absence d'amas plaquettaires sur le frottis.

Ensuite, la taille moyenne des amas plaquettaire présents ou non sur le frottis était scorée sur 10 champs à l'objectif à immersion (Objectif UPlanFl x 100/1.30 oil, Olympus, Japan) dont 5 sont choisis dans la queue de frottis et 5 autres sur les bords latéraux du frottis (Annexe 5). Une note comprise entre 0 et 5, d'après le barème du tableau 2, est attribuée à chaque champ. La moyenne de ces observations a été retenue [19] :

Score	Composition de l'agrégat
0	Aucun agrégat
1	2 à 4 plaquettes
2	5 à 9 plaquettes
3	10 à 19 plaquettes
4	20 à 29 plaquettes
5	Plus de 30 plaquettes

Tableau 2 : Grille de cotation de la taille des agrégats plaquettaires d'après le nombre de plaquettes les composant [19].

2.5 Analyse des données

Du fait de l'utilisation du CTAD et de l'ajout de cette association d'anticoagulants à l'EDTA, pour chaque spécimen, un facteur de dilution de 1.1 a été appliqué pour toutes les numérations mesurées du CTAD et EDCT (20 μ L de CTAD ont été ajouté à un tube EDTA de 200 μ L).

Les résultats obtenus pour chaque analyse ont été comparés en série appariée pour s'assurer de la pertinence d'utiliser les moyennes pour les comparaisons. Après avoir vérifié l'homogénéité des variances (test de Fisher), les séries ont été comparées entre elles par un test de Student en série appariées.

Touts les calculs on été effectués sur un tableur Excel® complétés si nécessaires par le logiciel STATAcomputer analysis®.

3 Résultats

3.1 Valeurs retenues pour l'analyse des données

46 spécimens ont été collectés au cours de l'étude. Seuls 2 chats, non inclus dans l'effectif total, n'ont pas pu être prélevés du fait de leur caractère agressif. Pour l'un d'entre eux, la tonte n'a pu être réalisée. Pour le second, la contention n'a pu être réalisée. Lors du prélèvement, moins de 10 chats ont très légèrement réagi lors de l'insertion de l'aiguille dans la veine.

En moyenne, la note attribuée aux chats prélevés concernant la difficulté de la contention était de 1.76 [0.77 – 2.75]. En moyenne, la note attribuée aux chats prélevés pour la difficulté du prélèvements était de 1.78 [0.97 – 2.60]. Les principales difficultés rencontrées lors du prélèvement était :

- Présence d'un tube mal rempli lié à un faible débit sanguin
- Une coagulation dans le capillaire malgré la présence d'anticoagulant
- Une coagulation dans l'aiguille utilisé pour le prélèvement qui a nécessité la mise en place d'une seconde aiguille sur le même membre ou le membre controlatéral.

Pour 8 d'entre eux, certains résultats n'ont pu être obtenu ou retenus du fait de problèmes pré-analytiques ou analytiques :

- Chats n°3, 7, 9, 11, 23 et 35 : le tube CTAD était trop ou pas assez rempli. Les chats ont donc été retirés de l'étude.
- Chat n°19 et 28 : un caillot sanguin s'est formé dans le tube CTAD, ce qui a ne nous as pas permis d'avoir de résultat pour ces tubes.

3.2 Comparaison des différentes mesures selon l'anticoagulant utilisé ou leur combinaison

3.2.1 Degré d'agrégation plaquettaire estimé par lecture du frottis sanguin

Le degré d'agrégation plaquettaire a été estimé à partir du nombre d'agrégat plaquettaire observé sur un frottis sanguin (Annexe 7).

Une réduction significative du degré d'agrégation plaquettaire est observée sur CTAD et EDCT par rapport à celui estimé sur EDTA (figure 5).

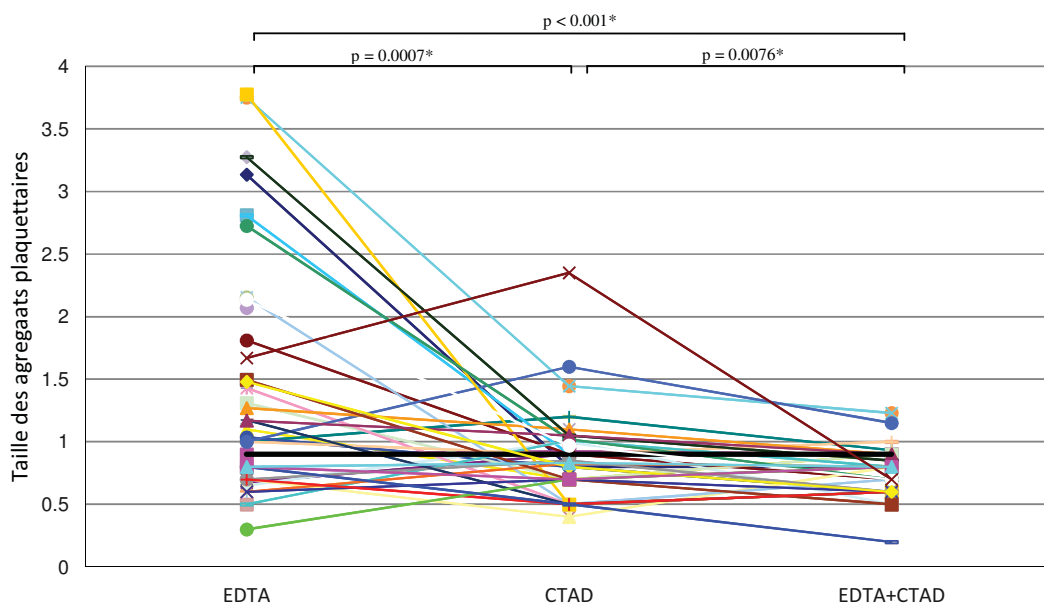


Figure 5 : Comparaison du degré d'agrégation plaquettaire estimé à partir du frottis sanguin en fonction de l'anticoagulant utilisé.

Anticoagulants utilisés : EDTA, CTAD et EDCT (EDTA + CTAD)

Le trait noir continu représente le degré d'agrégation plaquettaire moyen.

p = probabilité bilatérale du test de Wilcoxon sans correction

* = Résultats significatifs

Le degré moyen d'agrégats estimé sur EDTA, 1,42 [0,5 – 2,33], est significativement supérieur à ceux estimés sur CTAD, 0,88 [0,53 – 1,23], et sur EDCT, 0,75 [0,57 – 0,95]. Le degré d'agrégation plaquettaire est aussi significativement plus élevé sur CTAD que sur EDCT. En résumé, le degré d'agrégation plaquettaire est significativement plus bas sur EDCT que sur EDTA et CTAD.

3.2.2 Numération plaquettaire estimée par cytométrie en flux

Une nette augmentation de la numération plaquettaire mesurée par cytométrie en flux sur EDCT est observée par rapport à l'EDTA (figure 6).

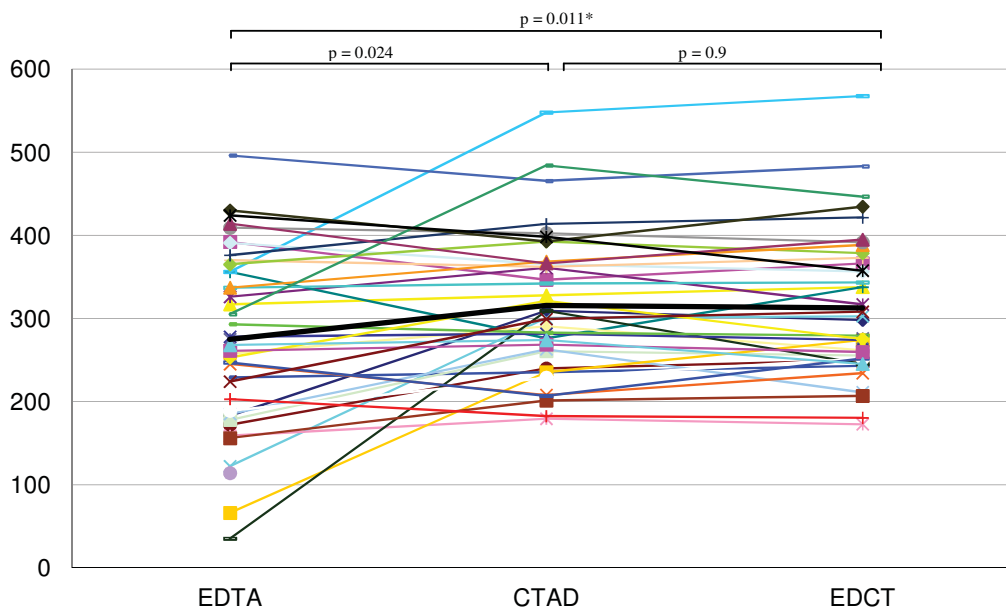


Figure 6 : Comparaison des numérations plaquettaires mesurées par cytométrie en flux en fonction de l'anticoagulant utilisé.

Anticoagulants utilisés : EDTA, CTAD, EDCT (EDTA + CTAD)

Le trait noir continu représente les numérations plaquettaires moyennes

p = probabilité bilatérale du test de Wilcoxon sans correction

* = résultat significatif

La numération plaquettaire moyenne obtenue par cytométrie en flux sur EDTA, $274 \cdot 10^9/L$ [167 – 382], est significativement inférieure que celle obtenue sur EDCT, $312 \cdot 10^9/L$ [227 – 397]. Aucune différence significative n'est observée sur CTAD, $315 \cdot 10^9/L$ [230 – 400] par rapport à l'EDTA et à l'EDCT.

DISCUSSION

Afin de rester critique face à notre étude, il est nécessaire de noter que l'étude a été réalisée sur un effectif réduit. De plus, pour respecter le bien être animal, les conditions de prélèvement permettent de limiter le stress. Dans de telles conditions, même si les résultats sont en accord avec les études faites chez le chat sur le CTAD, le nombre de spécimens sur EDTA présentant des thrombopénies ne correspond pas aux résultats de l'étude de Norman et al [19].

Ces résultats confirmeraient au fond l'importance du stress chez le chat sur la formation d'agrégats même s'il ne s'agit en rien de preuves scientifiques.

De plus, quelques précautions doivent être prises vis-à-vis des résultats obtenus dans cette étude. En effet, les prélèvements sur CTAD ou EDCT sont dilués par rapport à ceux sur EDTA. Les différentes numérations, concentrations et rapports de volume ont été corrigés par des facteurs de dilution, égal à 1.1. Mais ces opérations ajoutent une imprécision supplémentaire qu'il faut additionner à l'imprécision analytique. La dilution peut avoir des répercussions au niveau quantitatif mais aussi qualitatif.

Cependant, les résultats de notre étude sont en accord avec la littérature sur l'utilisation du CTAD chez l'homme et chez le chat, indiquant que le CTAD permet une inhibition de l'agrégation plaquettaire, soit un degré d'activation plaquettaire en général moins important que sur les prélèvements récoltés sur EDTA. L'association EDTA + CTAD semble elle aussi être intéressante puisqu'elle semble limiter l'agrégation plaquettaire plus efficacement que l'EDTA ou le CTAD utilisés seuls dans les prélèvements sanguins de chat.

Une augmentation significative de la numération plaquettaire mesurée par le Sysmex XT2000iV®, en cytométrie en flux, est notée sur EDTA + CTAD par rapport à l'EDTA utilisé seul. Aucune différence significative n'est notée entre les différents autres anticoagulants. L'ajout d'EDTA au CTAD semblerait augmenter significativement la numération plaquettaire chez le chat, associé à une diminution du degré d'agrégation plaquettaire.

L'association EDTA et CTAD semble tout à fait pertinente car elle permettrait d'obtenir des numérations plaquettaires automatisées plus fiables en diminuant l'état d'agrégation plaquettaire. Afin de confirmer l'intérêt de l'utilisation de l'association d'EDTA

et de CTAD dans la réalisation d'hémogramme chez le chat, l'effet de cette association devrait être évalué sur l'ensemble des analytes sanguins.

CONCLUSION

Cette étude expérimentale a permis de démontrer que lors de la réalisation d'un hémogramme dans l'espèce féline, en condition de stress limité sur microtubes capillaires, l'addition de CTAD à un tube EDTA permet de limiter l'agrégation plaquettaire et les erreurs qui en résultent. Parallèlement, la numération plaquettaire semble être plus fiable lors de l'ajout de CTAD à un tube EDTA en comparaison à l'EDTA seul. Le degré d'agrégation plaquettaire est significativement inférieur.

En pratique, cela signifie que les praticiens vétérinaires peuvent d'ores et déjà utiliser dans leur clinique, sur microtube capillaire *et sur les tubes de prélèvement classique*, l'association EDTA et CTAD ou le CTAD seul pour la réalisation d'hémogrammes.

Ces résultats encourageant nécessitent d'être poursuivis par la réalisation notamment d'intervalle de référence sur des tubes utilisant l'association EDTA et CTAD.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussignée, **TRUMEL Catherine**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **CHARRU Pauline** intitulée « *Comparaison de différentes associations d'anticoagulants sur les numérations plaquettaires et la formation d'agrégats chez le chat* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



Fait à Toulouse, le 20 juin 2011
Professeur **Catherine TRUMEL**
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur **Alain MILON**



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



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
27 JUIN 2011
Professeur **Gilles FOURTANIER**



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.



BIBLIOGRAPHIE


1. CAILLARD A. Influence du temps de conservation du sang sur l'hémogramme réalisé avec le Vet ABC chez le chien et le chat. Th D : Toulouse : 2002 ; 4104
2. COSONATO A., BERTOMORO A., PONTARA E., DANNHAUSE D., LAZZARO A.R., GIROLAMI A. (1994). EDTA dependant pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gpIIB-IIIa. *Am J Clin Pathol* **47**:645-630
3. DI MINNO G., SILVER M.J., DE GAETANO G. (1979). Prostaglandins as inhibitors of human platelet aggregation. *Bt J Haematol*;**43**:637-647
4. FELDMAN B.F., ZINKEL J.G., JAIN N.C. (2000). Schalm's Veterinary hematology. Fifth Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. p3-11; 448-467;1057-1068
5. FLECKNELL P.A., LILES J.H. WILLIAMSON H.A. (1990). The use of linocaine-prilocaine local anaesthetic cream for pain-free venepuncture in laboratory animals. *Lab Anim*;**24**:142-146.
6. GIBBON K.J., CYBORSKI J.M., GUZINSKI M.V., VIVIANO K.R., TREPANIER L.A. (2003). Evaluation of adverse effects of EMLA (lidocaine/prilocaine) cream for the placement of jugular catheters in healthy cats. *J Vet Pharmacol Ther*;**26**(6):439-441
7. GRANAT F. Comparaison de l'effet de différents agents antiagrégants sur le degré d'agrégation plaquettaire et leur impact sur les comptages plaquettaires et leucocytaires dans des prélèvements sanguins de chat. Th D : Toulouse : 2009 ; T0U3-4085
8. GRYGLEWSKI R.J., KORBUT R., OCETKIEWICZ A. (1978). De-aggregatory action of prostacyclin in vivo and its enhancement by theophylline. *Prostaglandins*;**15**: 637-643
9. HINCHCLIFF K.W., KOCIBA G.J., MITTEN L.A. (1993). Diagnosis of EDTA-dependent pseudothrombocytopenia in a horse. *J Am Vet Med Assoc*;**203**(12): 1715-1716
10. JENSEN A.L., KJELGAARD-HANSEN M. (2006). Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol*;**35**(3): 276-285
11. KRONEN P.W., LUDDERS J.W., ERB H.N, MOON P.F., GLEED R.D., KOSKI S. (2006). A synthetic fraction of feline facial pheromones calms but does not reduce struggling in cats before venous catheterization. *Vet Anaesth Analg*;**33**:258-265.

12. 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. *Clin Chem*;48(6): 891-899.
13. MACKIN A. (2006). Platelet disorders. In: *Consultations in feline internal medicine* St Louis, Missouri, Elsevier Saunders. 5: 575-584
14. MAJID SHOJANIA A., TURNBULL G. (1987). Effect of heparin on platelet count and platelet aggregation. *Am J Hematol*;26: 255-262
15. Mc NICOL A. (1996). Platelet preparation and estimation of functional responses. In: Watson SP, Authi KS, eds. *Platelet. A practical approach*. Oxford UK: Oxford University Press, 1-26.
16. 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 Pathol*;35:18–23.
17. MEINKOTH J.H., ALLISON R.W. (2007). Sample collection and handling: getting accurate results. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*;37:203-219
18. MEYER D.J., HARVEY R.W. (1998). *Veterinary laboratory medicine*. Second Edition. Philadelphia, WB Saunders. 345p.
19. NORMAN E.J., BARRON R.C.J., NASH A.S., CLAMPITT R.B. (2001). Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell counts. *Vet Clin Pathol*;30(3):124-132
20. 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
21. PHILP R.B. (1970). Species dependent inhibition platelet aggregation by adenosine dipyridamole paradoxal potentiation rat. *Thromb Diath Haemor*;23:129-139
22. POOLE AW. (1996). The study of platelet function in other species. In: Watson SP, Authi KS, eds. *Platelet. A practical approach*. Oxford UK: Oxford University Press:341-350.
23. REYNOLDS B.S., BOUDET K.G., FAUCHER M.R., GERMAIN C., GEFFRE A., LEFEBVRE H.P. (2007). Comparison of a new device for blood sampling in cats with a vacuum tube collection system – plasma biochemistry, hematology and practical usage assessment. *J Fel Med Surg*;9:382-386

24. RICHARD A., SAVAGE M.D. (1984). Pseudoleukocytosis due to EDTA-induced platelet clumping. *Am J Clin Pathol* **81**(3):317-321
25. SAKURAI S., SHIOJIMA I., TANIGA W.A., NAKAHARA K. (1997). Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. *Bt J Haematol*; **99**:817-823
26. STOCKHAM S.L., SCOTT M.A. (2002). Fundamentals of veterinary clinical pathology. First Edition. Blackwell Publishing company, Iowa State Press, 908p
27. TASKER S., CRIPPS P.J., MACKIN A.J. (1999). Estimation of platelet counts on feline blood smears. *Vet Clin Pathol*; **28**:42-45.
28. TSCHOPP T.B. (1970). Aggregation of cat platelets in vitro. *Thromb Diath Haemor*; **23**(3):601-620
29. VERMYLEN J., DECKMYN H. (1993). Antiplatelet agents: pharmacology and clinical use. In: Poller L, ed. *Recent Advances in Blood Coagulation*. Number 6. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone; 125-144.
30. WEISER M.G., KOCIBA G.J. (1984). Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats. *Am J Vet Res*; **45**:518-522
31. WELLES E.G., BOURNE C., TYLER J.W. (1994). Detection of activated feline platelets in platelet-rich plasma by use of fluorescein-labeled antibodies and flow cytometry. *Vet Clin Pathol*; **31**:553-560
32. WILLARD M.D., TVEDTEN H., TURNWALD G.H. (1994). Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. Second Edition. Philadelphia, WB Saunders. 359p.
33. WILLS T.B., WARDROP K.J. (2008). Pseudothrombocytopenia secondary to the effect of EDTA in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*; **44**:95-97
34. YOUNG A.C., SHORTHALL A., HAYNES W ans YOUNG G. (1987). Lignocaine-prilocaine cream for lumbar puncture. *Lancet*; **1**(26):1533
35. ZELMANOVIC D., HETHERINGTON E.J. (1998). Automated analysis of feline in whole blood, including platelet count, means platelet volume, and activation state. *Vet Clin Pathol*; **27**(1):2-9

ANNEXES

Annexe 2 : Formulaire de consentement éclairé

 <p>ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE TOULOUSE</p>	<p>Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : +33 561 193 295; mail : a.geffre@envt.fr</p>	<p>Annexe n° 2 FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE</p>
<p>Comparaison de différentes associations d'anticoagulants sur les numérations plaquettaires et la formation d'agrégats chez le chat</p>		

Étude effectuée aux cliniques de l'école Vétérinaire de Toulouse (ENVT) entre Octobre 2009 et Février 2010.

Le but de cette étude est de comparer deux antiagrégants plaquettaires chez le chat, afin de déterminer lequel est le plus efficace. Les prélèvements seront réalisés de façon à minimiser le stress chez les chats (tonte à la maison et anesthésie locale avec de la crème Emla®).

Chaque animal inclus dans l'étude sera examiné avant tout prélèvement, suivi pendant et après ceux-ci conformément au protocole expérimental qui vous a été remis.

Je, soussigné(e)

Propriétaire du chat

N° d'identification (éventuellement)

Atteste avoir lu les paragraphes précédents et avoir reçu copie du protocole expérimental de l'étude


Atteste avoir été clairement informé du caractère facultatif de cette étude et avoir conscience de ma totale liberté de refuser que mon chat y participe

Et accepte que mon chat soit inclus dans l'étude

À Toulouse, le

Signature

Annexe 3 : Protocole expérimental

 <p>ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE TOULOUSE</p>	<p style="text-align: center;">Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : +33 561 193 831; mail : c.trumel@envt.fr</p>	<p style="text-align: center;">PROTOCOLE</p>
<p style="text-align: center;">Comparaison de différentes associations d'anticoagulants sur les numérations plaquettaires et la formation d'agrégats chez le chat</p>		

1. Problématique et objectifs

Chez le chat, le comptage des plaquettes est souvent peu interprétable car peu fiable. En effet, Norman et al (2001) [20] a montré que sur 359 hémogrammes effectués chez le chat, 256 montraient une numération plaquettaire inférieure à la limite inférieure de l'intervalle de référence. Cette thrombocytopénie n'a été confirmée par lecture du frottis sanguin que chez 11 chats [27] ; dans tous les autres cas, la numération faible était liée à la présence d'agrégats plaquettaires et / ou à la présence de plaquettes de grande taille. La très forte proportion de spécimens présentant des agrégats plaquettaires pouvait être liée à l'espèce étudiée connue pour sa forte tendance à avoir des plaquettes agrégeant spontanément in vitro [35], aux conditions de prélèvement et le délai entre prélèvement et analyse [16]. Les conditions analytiques et pré-analytiques semblent jouer un rôle clé chez le chat. Les conditions (stress, vigile, anesthésie) et le mode de prélèvement (seringue / vide ; jugulaire / patte) [13], l'anticoagulant, le délai entre prélèvement et analyse et l'automate sont cinq facteurs qui ont fait l'objet de diverses études.

Une étude effectuée au laboratoire [7] a démontré que l'utilisation d'une association d'anticoagulant EDTA et CTAD (Citrates, Théophylline, Adénosine et Dipyridamole) chez le chat permettait de réduire la formation d'amas plaquettaires. Mais cette étude a été réalisée sur de gros volume de sang prélevés à la veine jugulaire (5mL), ce qui est peu représentatif d'un prélèvement fait par un clinicien. D'autre part, l'effet du CTAD seul n'a pas pu être étudié pour des raisons éthiques.

Les microtubes capillaires, d'utilisation récente en médecine vétérinaire, semblent présenter un réel intérêt lors de prélèvements sanguins chez le chat, en raison de leur facilité d'utilisation et du faible volume de prélèvement nécessaire [23]. Mais si l'intérêt est réel lors d'analyses biochimiques, l'analyse hématologique semble plus délicate. En pratique (résultats

non publiés), la formation d'amas plaquettaires semble plus fréquente que pour un tube classique.

L'objectif de cette étude est donc de comparer les effets de divers anticoagulants sur microtube, en utilisant l'EDTA, le CTAD ou l'association EDTA et CTAD, sur la numération des plaquettes chez le chat obtenue par cytométrie en flux, ainsi que sur la formation des agrégats plaquettaires objectivée sur frottis sanguin.

Pour des raisons éthiques et afin de minimiser tout effet préanalytique et de nous focaliser sur l'aspect analytique, notre étude porte sur une population de chats cliniquement sains prélevés dans des conditions de stress réduites.

2. Personnes impliquées

L'étude est effectuée et coordonnée par Hélène LEMOINE et Pauline CHARRU, sous la responsabilité de C. Trumel, avec l'assistance de :

- C. Trumel : préparation du protocole, interprétation des données
- H. Lemoine : interprétation des résultats, préparation du protocole
- J. Mortier : réalisation des prélèvements
- P. Charru : recrutement et préparation des chats

3. Période et durée de l'étude

Du 29 octobre 2009 au 4 février 2010.

4. Protocole expérimental

1. Recrutement des animaux

Un nombre suffisant de prélèvements sera effectué pour obtenir 40 résultats exploitables. Les chats inclus ont tous plus de 6 mois, sont en bonne santé, sans pathologie connue.

Les animaux ont été recrutés parmi les étudiants de l'École vétérinaire de Toulouse, sur la base du volontariat. Ci-joint, le planning de prise de rendez-vous tout au long de la période de l'étude (annexe 6).

Les animaux sont inclus uniquement après complète information du propriétaire et la signature du « Formulaire de consentement éclairé » (annexe 2).

Chaque chat sélectionné pour l'étude aura une fiche d'accompagnement du prélèvement sur laquelle sera inscrit le nom du propriétaire, son numéro de dossier, son numéro d'identification pour l'étude et une fiche d'analyse sur laquelle ne sera mentionnée que son numéro d'étude. Les chats sont identifiés de la façon suivante ; « de 1 à X ». Pour préserver l'anonymat, seul le numéro de l'étude sera présent sur les résultats d'analyses.

2. Préparation des chats sélectionnés

Dans la journée précédant le rendez-vous :

Chez le propriétaire, la préparation du chat consiste à tondre les 2 antérieurs en regard de la veine céphalique. A l'aide d'une tondeuse adaptée au chat (silencieuse), le propriétaire tond un carré de 2 cm de long sur 1,5 cm face à la veine céphalique au milieu de l'antérieur.

Dans l'heure précédant la prise de sang, chez le propriétaire :

Le propriétaire dépose une dose de crème anesthésique sur la peau au niveau des zones de tonte (crème composée de 2,5% de lidocaïne et de 2,5% de prilocaïne : EMLA cream®, Astra Zeneca, Wilmington DE, USA). La pose de la crème doit avoir lieu 1 heure avant le rendez-vous, le temps que les anesthésiques fassent effet. D'après la littérature, l'effet de la crème est optimal en une heure et dure jusqu'à 6 heures chez le chat selon Gibbon et *al* [6].

Pour le transport :

Les animaux sont transportés dans leur boîte de transport. On peut avoir recours pour sécuriser l'animal dans sa cage de transport à l'utilisation de Feliway® (solution à vaporiser composée 10% de la fraction F3 d'analogue structural de phéromones faciales du chat : Feliway®, CEVA Santé animale, Libourne, France) sous forme de solution à vaporiser. Trente minutes avant l'introduction du chat dans la cage, le propriétaire effectue une pulvérisation aux 4 coins de la cage, 2 pulvérisations au sol et 2 au plafond.

A l'arrivée pour le rendez-vous :

Les rendez-vous sont pris de façon à ce que les animaux ne se croisent pas en salle d'attente. L'attente doit être limitée voire nulle.

3. Examen clinique

Chaque chat est examiné à son arrivée par le Docteur J Mortier. On procède à un examen clinique complet (annexe 1) dans une salle adaptée et calme.

4. Prélèvements

La prise de sang est réalisée sur un membre antérieur, au niveau de la zone de tonte anesthésiée par le Docteur J. Mortier. La contention, réalisée par P Charru, doit être minimale mais doit permettre la réalisation du prélèvement. Le propriétaire peut aider à la contention si besoin. La compression de la veine céphalique est réalisée à la main, par P Charru.

Le prélèvement est réalisé par le Docteur J Mortier. Une aiguille 25 G x 5/8" (Aiguille stérile Orange 0.5 mm-16 mm, BD Microlance 3, Drogheda, Ireland) est introduite dans la veine. On peut procéder au prélèvement.

Pour chaque chat, les 3 prélèvements (EDTA, CTAD, EDTA+CTAD) sont effectués dans un ordre aléatoire déterminés à l'avance par H. Lemoine avec l'aide du tableur Excel®.

Les 3 tubes différents ont été préparés au laboratoire par H. Lemoine :

- Un minitube collecteur de 200µL EDTA (EDTA 200µL, Minicollect®, Greiner-bio-one), identifié pour chaque chat « n° CTxEDTA »
- Un minitube sec (500µL, Minicollect®, Greiner-bio-one) dans lequel on aura préalablement ajouté 50 µL de CTAD, identifié « n° CTxCTAD »
- Un minitube EDTA (EDTA 200µL, Microvette®, Sarstedt), dans lequel on aura également ajouté 20 µL de CTAD, identifié « n° CTxEDCT ».

Les prélèvements sont ensuite homogénéisés par 10 retournements lents. Chaque tube est identifié selon la procédure mentionné en 4.1. L'heure du prélèvement est notée sur la feuille d'accompagnement du chat.

5. Analyses

1. Contrôles de qualité

Le Sysmex XT2000iV® est contrôlé chaque matin par C. Germain, F. Palanché ou C. Marche selon le protocole de routine du laboratoire :

Un niveau de contrôle sera effectué. Si une ou plusieurs mesures de contrôle est (sont) en dehors des cibles fournies par le fabricant, les diverses opérations correctrices prévues par le fabricant sont mises en œuvre pour s'assurer du bon fonctionnement des mesures jusqu'à résolution du problème et obtention des résultats de contrôles dans les cibles.

2. Critères d'exclusion au laboratoire

Sont exclus de l'étude :

- Les tubes n'ayant pas un volume de sang prélevé suffisant, ou un volume trop important.
- Les tubes de sang présentant un caillot macroscopique

3. Procédures effectuées sur chaque spécimen

Dès leur arrivée au laboratoire, tous les spécimens sont ensuite placés pendant 20 minutes sur l'agitateur (Speci Mix®, Oxford, CT06478 USA). Les analyses sont faites, de la même façon pour les 3 tubes EDTA, CTAD et EDCT selon les modalités suivantes :

- Une analyse, après 30 retournements, sera effectuée sur le Sysmex XT2000iV® ainsi qu'un frottis sanguin. Il sera reporté sur la feuille d'analyse du chat avec l'heure de réalisation ainsi que les résultats concernant les numérations plaquettaires (optique). Les frottis seront colorés et montés puis conservés dans une boîte prévue pour l'étude.
- Les frottis sanguins sont lus tous en même temps selon la procédure présentée en annexe 5 à la fin des analyses effectuées pour un animal donné et les résultats reportés sur la fiche d'analyse de ce dernier.

Une photocopie de toutes les impressions des résultats de ces analyses ainsi que toutes les feuilles d'accompagnement sont conservées par H. Lemoine dans le cahier de manipulation qui lui a été remis. Un fichier Excel® est rempli par H. Lemoine quotidiennement pendant toute la durée de l'étude. Il est composé d'une ligne par animal sélectionné, comprenant dans les colonnes tous les résultats concernant les numérations

plaquettaires en variation d'impédance et en cytométrie. Des colonnes correspondant à la lecture des frottis sont également remplies selon la procédure définie par Norman pour l'estimation de la taille des agrégats [20.]

6. Interprétation des résultats scientifiques – statistiques

Le fichier Excel est transmis par e-mail chaque semaine à C. Trumel et J.P. Braun. Les calculs statistiques sont effectués par JP Braun grâce au logiciel Excel® et Analyse-It®.

Annexe 4 : Feuille d'analyse



N° ÉTUDE :

Date du prélèvement :

Heure de début du prélèvement :

Heure du traitement des prélèvements :

Résultats bruts :

	Taille moyenne des AP au bord du frottis (/champ à l'objectif à immersion x 1000)					Taille moyenne des AP en queue de frottis (/champ à l'objectif à immersion x 1000)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
EDTA										
CTAD										
EDCT										

	P-O	AP-F
EDTA		
CTAD		
EDCT		


P-I : Numération plaquettaire par variation d'impédance ($10^9/L$)

P-O : Numération plaquettaire par cytométrie en flux ($10^9/L$)

AP-F : Estimation moyenne de la taille des amas plaquettaire d'après le frottis sanguin en nombre de plaquettes

AP : Agrégat plaquettaire

Annexe 5 : Réalisation d'un frottis sanguin

	Unité de Biologie Médicale Animale et Comparée ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 87614 31076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : +33 561 193 295; mail : a.geffre@envt.fr	Protocole
Estimation de la taille moyenne des agrégats plaquettaires d'après un frottis sanguin chez le chat		Annexe 5

1. Réalisation du frottis sanguin :

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.



Figure 7 : Réalisation d'un frottis sanguin

La coloration du frottis s'effectue de façon automatique par un automate dédié à cette fonction (Aerospray®, Hematology slide stainer-cyto centrifuge, 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) concentré SS-172A).

La lecture du frottis est uniquement réalisée à la fin de l'obtention de tous les résultats concernant un échantillon donné, par le même manipulateur et sous un unique microscope standard (Olympus BX60, oculaire Olympus Japan WH10X/22) tout au long de la manipulation.

2. Estimation de la taille des amas plaquettaires observés sur le frottis :

Pour déterminer la taille moyenne des amas plaquettaires présents ou non sur le frottis, le lecteur va les scorer. Il suffit de donner une note aux amas observés et d'en faire une moyenne, ceci sur 10 champs à l'objectif à immersion, dont 5 étant choisis dans la queue du frottis et 5 autres sur les bords latéraux. La note est comprise entre 0 et 5 d'après le barème suivant d'après Norman et al, 2001:

Tableau 3 : Grille de cotation de la taille des agrégats plaquettaires d'après le nombre de plaquettes les composant [19].

Score	Composition de l'agrégat
0	Aucun agrégat
1	2 à 4 plaquettes
2	5 à 9 plaquettes
3	10 à 19 plaquettes
4	20 à 29 plaquettes
5	Plus de 30 plaquettes

Une taille moyenne des agrégats plaquettaires, lorsqu'ils existent, est enfin calculée à partir des données obtenues pour chacun des frottis.

Annexe 6 : Liste des animaux retenus pour l'étude

N° Étude	Date de prélèvement	Cont. Prélèv.	Données non exploitables	Commentaires
1	29.10.09	1 1		Reprise du tube CTAD entre les tubes EDCT et EDTA
2	29.10.09	1 1		
3	05.11.09	3 1	x	CTAD rempli à moitié
4	05.11.09	3 2		
5	05.11.09	3 2		
6	05.11.09	2 1		
7	12.11.09	5 3	x	CTAD rempli à moitié
8	12.11.09	3 2		
9	12.11.09	1 2	x	CTAD rempli aux ¾ - EDTA limite car faible débit
10	12.11.09	1 1		
11	12.11.09	2 1	x	CTAD rempli à moitié
12	12.11.09	4 4		Coagulation dans capillaire du tube CTAD Utilisation d'un 2ème tube CTAD qui a été analysé
13	19.11.09	1 1		
14	19.11.09	3 3		
15	19.11.09	1 1		
16	19.11.09	1 1		
17	19.11.09	1 2		
18	26.11.09	2 3		

Annexe 6 : Liste des animaux retenus (suite)

N° Étude	Date de prélèvement	Cont. Prélèv.	Données non exploitables	Commentaires
19	26.11.09	1 3	Pas de valeur pour CTAD	Changement aiguille entre EDTA et CTAD Caillot dans le tube CTAD
20	26.11.09	1 1		
21	26.11.09	1 2		
22	26.11.09	2 1		
23	03.12.09	2 3	x	CTAD rempli à moitié Changement aiguille entre CTAD et EDCT (même patte) Changement aiguille entre EDCT et EDTA (même patte)
24	03.12.09	1 3		
25	03.12.09	1 2		
26	03.12.09	1 1		
27	10.12.09	1 2		
28	10.12.09	1 2	Pas valeur CTAD	Caillot
29	10.12.09	2 2		
30	10.12.09	1 1		
31	10.12.09	1 1		
32	10.12.09	1 1		
33	10.12.09	2 2		FIV positif
34	17.12.09	1 1		
35	17.12.09	3 2	x	CTAD trop rempli
36	17.12.09	3 2		
37	17.12.09	2 3		

Annexe 6 : Liste des animaux retenus pour l'étude (suite)

N° Étude	Date de prélèvement	Cont.	Prélèv.	Données non exploitables	Commentaires
37 bis	14.01.10	3	1		Erreur notation, même ordre passage tube que N°37
38	14.01.10	1	2		
39	14.01.10	3	2		
40	14.01.10	1	1		
41	04.02.10	1	1		
42	04.02.10	2	3		
43	04.02.10	1	1		
44	04.02.10	2	2		
45	04.02.10	1	2		

Cont. : Difficulté de la contention pendant le prélèvement notée de 1 à 5 (1 correspondant à une contention sans difficulté).

Prélèv. : Difficulté à la réalisation du prélèvement notée de 1 à 5 (1 correspondant à un prélèvement sans difficulté).

Annexe 7 : Résultats détaillés de l'étude

Tableau 4 : Numérations plaquettaires obtenues par cytométrie en flux pour 46 prélèvements sanguins de chats en fonction de l'anticoagulant utilisé ($10^9/L$)

N°Étude	EDTA	CTAD	EDCT
1	183	390.1	298.1
2	392	346.5	366.3
3	198	272	193.6
4	317	327.8	337.7
5	122	300.3	302.5
6	326	360.8	316.8
7	302	472.6	343.2
8	172	239.8	249.7
9	377	526.25	479.6
10	356	276.1	337.7
11	242	357	250.8
12	229	235.4	243.1
13	356	547.8	567.6
14	391	365.2	356.4
15	178	260.7	255.2
16	258	290.4	261.8
17	185	262.9	211.2
18	159	179.3	172.7
19	114	***	260.7
20	370	361.9	372.9
21	496	465.3	482.9
22	337	342.1	343.2
23	567	782	543.4
24	365	392.7	378.4
25	66	235.4	273.9
26	337	368.5	388.3
27	245	207.9	234.3
28	275	***	276.1
29	409	402.6	391.6
30	376	413.6	421.3
31	305	484	446.6
32	35	309.1	245.3
33	430	392.7	434.5
34	156	201.3	206.8
35	152	188.76	192.5
36	414	366.3	394.9
37	278	281.6	273.9
37 bis	424	398.2	357.5
38	189	228.8	251.9
39	203	182.6	180.4
40	293	282.7	279.4
41	247	206.8	251.9
42	253	321.2	275
43	261	268.4	259.6
44	268	273.9	245.3
45	224	299.2	308

■ : animaux retirés de l'étude

*** : données manquantes

Annexe 7 : Résultats détaillés de l'étude (suite)

Tableau 5 : Degré d'agrégation plaquettaire estimé à partir du frottis sanguin pour 46 prélèvements sanguins de chats en fonction de l'anticoagulant utilisé.

N° Étude	EDTA	CTAD	EDCT
1	3.135	0.8	0.8
2	0.9	0.925	0.9
3	0.6	0.9	0.6
4	1.1	0.7	0.9
5	3.75	1.445	1.23
6	0.675	0.9	0.9
7	1.69	0.8	0.8
8	1.81	0.9	0.7
9	1.45	1	1.059
10	1	1.2	0.933
11	1.1	0.8	0.6
12	1.035	0.8	0.6
13	2.81	0.9	0.9
14	0.65	1	0.5
15	1.31	0.7	0.9
16	0.7	0.4	0.8
17	2.155	0.5	0.7
18	1.43	0.5	0.6
19	2.07	***	0.7
20	1	0.9	1
21	1	1.6	1.15
22	0.5	1.01	0.8
23	1.08	1.05	1.1
24	1.675	1.04	0.9
25	3.775	0.5	0.6
26	1.27	1.1	0.9
27	0.6	0.825	0.8
28	0.7	***	0.5
29	0.7	0.85	0.6
30	1.175	0.5	0.6
31	2.725	1.02	0.7
32	3.275	1.05	0.85
33	0.8	0.7	0.7
34	1.495	0.7	0.5
35	2.46	0.99	0.8
36	1.17	1.05	0.9
37	0.6	0.7	0.6
37 bis	0.9	0.9	0.9
38	2.135	0.97	0.7
39	0.7	0.5	0.6
40	0.3	0.7	0.8
41	0.8	0.5	0.2
42	1.48	0.8	0.6
43	0.8	0.7	0.8
44	0.8	0.83	0.8
45	1.67	2.35	0.7

■ : animaux retirés de l'étude

*** : données manquantes

NOM : CHARRU Pauline

TITRE DE LA THÈSE : Comparaison de différentes associations d'anticoagulants sur les numérations plaquettaires et la formation d'agrégats chez le chat

RESUME :

Chez le chat, l'hémogramme est un examen complémentaire parfois difficile à interpréter aux vues des nombreuses difficultés d'ordre pré-analytique et analytique potentielle. Parmi elles, on retiendra la forte tendance des plaquettes à s'agréger *in vitro*, surtout sur EDTA. Les agrégats entraînent fréquemment une sous-estimation de la numération plaquettaire automatisée. Dans le but de limiter leur formation EDTA-dépendante, une nouvelle molécule antiagrégante a montré son intérêt : le CTAD (Citrate, Théophylline, Adénosine et Dipyridamole). Dans notre étude, l'utilisation de l'association EDTA et CTAD chez 46 chats sains, en éliminant certains facteurs pré-analytiques (stress de l'animal et temps de conservation), a permis de limiter significativement la formation d'agrégats et ainsi obtenir une numération plaquettaire plus fiable. Le CTAD utilisé seul a lui aussi permis de diminuer la formation d'agrégats sans pour autant améliorer significativement la numération plaquettaire.

MOTS CLES : Hémogramme, plaquettes, agrégat plaquettaire, anticoagulant, EDTA, CTAD, cytométrie en flux, Sysmex XT2000iV®, féline, chat

SUMMARY:

The complete blood count on cats is a complementary examination sometimes difficult to interpret because of the many potential pre-analytic and analytic problems that can occur. Among them, we have to consider the tendency of platelets to aggregate *in vitro*, especially in EDTA samples. Platelet clumping frequently leads to an imprecision of the platelets automated count. In order to limit this aggregation caused by EDTA, a new anti-aggrenant agent is studied: CTAD (Citrate, Theophylline, Adenosine and Dipyridamole). In our study, the use of the association EDTA and CTAD on 46 feline blood samples taking with limited pre-analytic factors (free of stress and storage) limited platelet clumping. So this association enabled to obtain more accurate platelet count in feline blood samples. Sampling made with CTAD alone limited platelet clumping without significantly improvement of platelet count.

KEY WORDS: complete blood cell count, platelet, platelet clumping, anticoagulant, EDTA, CTAD, flow cytometric analysis, Sysmex XT2000iV®, feline, cat