



HAL
open science

Intérêt de l'utilisation des tubes ThromboExact® pour limiter la présence d'agrégats plaquettaires lors d'analyse hématologique chez le chat

Théo Chenal

► To cite this version:

Théo Chenal. Intérêt de l'utilisation des tubes ThromboExact® pour limiter la présence d'agrégats plaquettaires lors d'analyse hématologique chez le chat. Médecine vétérinaire et santé animale. 2021. dumas-04529810

HAL Id: dumas-04529810

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04529810>

Submitted on 2 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2021 THESE : 2021 – TOU 3 – 4056

INTERET DE L'UTILISATION DES TUBES THROMBOEXACT[®] POUR LIMITER LA PRESENCE D'AGREGATS PLAQUETTAIRES LORS D'ANALYSE HEMATOLOGIQUE CHEZ LE CHAT

THESE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

CHENAL Théo

Né le 29/11/1996 à MONTBELIARD (25)

Directrice de thèse : Mme Catherine TRUMEL

JURY

PRESIDENTE :
Mme Véronique DE MAS

Professeure à l'Université Paul Sabatier

ASSESSEURES :
Mme Catherine TRUMEL
Mme Fanny GRANAT

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation
ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie – Thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

PROFESSEURS CERTIFIÉS 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 **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie – Analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- 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*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
- Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- Mme **CHARTIER Camille**, *Nouveaux animaux de compagnie*
- M. **FERCHIOU Ahmed**, *Economie, production animale*
- Mme **MANTELLI Morgane**, *Médecine interne*
- Mme **MAURIN Claire**, *Nouveaux animaux de compagnie*
- Mme **TOUSSAINT Marion**, *Pathologie des équidés*

ENSEIGNANTS DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES VETERINAIRES

- M. **AUFFRET Jérémy**, *Physique-Chimie*
- Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **BESSIERE Pierre**, *Microbiologie infectiologie*
- Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*
- M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Véronique DE MAS,
Médecin-Enseignant-Chercheur, Praticien hospitalier

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,
Biologie Médicale Animale et Comparée

Qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse,
Merci pour votre confiance, votre disponibilité et votre soutien
Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Fanny GRANAT,
Maître de conférences de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse
Biologie médicale animale,

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury de thèse
Sincères remerciements.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	13
PREMIÈRE PARTIE (Étude bibliographique) : LE SULFATE DE MAGNÉSIUM, UN ANTIAGREGANT PLAQUETTAIRE INTÉRESSANT ET DISPONIBLE EN MÉDECINE HUMAINE.....	17
1. Les propriétés antiplaquettaires du magnésium.....	18
1.1. Les mécanismes de l'activation et de l'agrégation plaquettaire.....	18
1.1.1. Bref rappel sur l'anatomie des plaquettes.....	18
1.1.2. Les récepteurs membranaires activent différentes voies de signalisation.....	19
1.1.3. L'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ permet la fixation du fibrinogène, étape clé de l'agrégation.....	25
1.1.4. Des mécanismes inhibiteurs régulent l'activation plaquettaire.....	28
1.2. Les différents effets du magnésium sur les plaquettes.....	28
1.2.1. Le magnésium agit sur la membrane plasmique des plaquettes.....	29
1.2.2. Le magnésium régule l'activité des intégrines via les sites MIDAS.....	29
1.2.3. Le magnésium inhibe la mobilisation intracellulaire de calcium....	30
1.2.4. Le magnésium stimule la production d'AMPc.....	31
1.2.5. Le magnésium stimule la production de PGI2 par les cellules endothéliales.....	31
2. L'intérêt de l'utilisation du tube ThromboExact® en médecine humaine.....	32
2.1 Les pseudo-thrombopénie dépendantes des anticoagulants chez l'Homme...32	
2.2 Le tube ThromboExact® réduit l'agrégation plaquettaire dans le cas de pseudothrombopénie chez l'Homme.....	34
2.3 Influence du tube ThromboExact® sur les paramètres hématologiques.....	35
2.3.1 Influence du tube ThromboExact® sur la numération plaquettaire.....	36

2.3.2Influence du tube ThromboExact® sur le volume plaquettaire.....	37
2.3.3Influence du tube ThromboExact® sur les autres variables hématologiques.....	37

SECONDE PARTIE (Étude expérimentale) : L'UTILISATION DU TUBE THROMBOEXACT® DANS L'ESPÈCE FÉLINE.....40

1. Protocole.....	41
1.1. Personnes impliquées.....	41
1.2. Période et durée de l'étude.....	41
1.3. Protocole expérimental.....	41
1.3.1. Recrutement des animaux.....	41
1.3.2. Prélèvements.....	41
1.4. Étapes pré-analytiques et analytiques.....	42
1.5. Étapes post-analytiques.....	43
1.5.1 Résultats.....	43
1.5.2 Interprétation des résultats scientifiques – statistiques.....	43
2. Résultats.....	44

DISCUSSION.....47

CONCLUSION.....49

BIBLIOGRAPHIE.....51

ANNEXES.....59

Annexe 1 : Protocole expérimental	60
Annexe 2 : Matériel de prélèvement	64
Annexe 3 : Résultats détaillés de l'étude.....	66

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Les voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	23
Figure 2 : L'augmentation de la concentration calcique permet l'activation de l'intégrine α IIb β 3.....	27
Figure 3 :Résumé des mécanismes de l'agrégation plaquettaire.....	27
Figure 4 :Mécanismes d'activation de l'intégrine α IIb β 3 chez les personnes souffrant de PTCP EDTA-dépendante.....	33
Figure 5 : Photographies d'agrégats plaquettaires, microscope optique grossissement x400 (A) et x1000 (B).....	45
Figure 6 : Photographies d'ALP, microscope optique grossissement x400 (A) et x1000 (B)..	45
Figure 7 : Photographies d'agrégats leucocytaires, microscope optique grossissement x400 (A) et x1000 (B).....	45
Figure 8 : Principales voies de liaison entre les plaquettes et les neutrophiles/monocytes.....	47
Figure 9 : Tube ThromboExact®.....	64
Figure 10 : Tube K3-EDTA.....	65
Figure 11 : Matériel de prélèvement démonté.....	66
Figure 12 : Matériel de prélèvement monté.....	66

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des récepteurs membranaires des plaquettes.....	24
Tableau 2 : Données de l'étude comparative (Comp).....	67
Tableau 3 : Données de l'étude sur la même période (Per).....	67
Tableau 4 : Corrélation de Spearman entre la présence d'agrégats plaquettaires et la numération plaquettaire (Per).....	68
Tableau 5 : Test Wilcoxon et t-paired, numération plaquettaire en fonction de l'anticoagulant (Comp).....	69
Tableau 6 : Corrélation de Spearman entre la présence d'agrégats plaquettaires et la numération plaquettaire (Comp).....	70
Tableau 7 : Corrélation de Spearman entre la présence d'agrégats plaquettaires et la numération plaquettaire (Per).....	71
Tableau 8 : Corrélation de Spearman entre la présence d'ALP et la numération plaquettaire (Per).....	72
Tableau 9 : Corrélation de Spearman entre la présence d'ALP et la numération plaquettaire (Comp).....	73
Tableau 10 : Test Mann-Whitney, score agrégats plaquettaires en fonction de l'anticoagulant (Per).....	74
Tableau 11 : Test Wilcoxon et t-paired, score agrégat plaquettaire en fonction de l'anticoagulant (Comp).....	75
Tableau 12 : Test Mann-Whitney score ALP en fonction de l'anticoagulant (Per).....	76
Tableau 13 : Test Wilcoxon et t-paired score ALP en fonction de l'anticoagulant (Comp)....	77

LISTE DES ABREVIATIONS

ACD : Acide citrate dextrose

ALP:Agrégats leuco-plaquettaires

AMP, ADP, ATP : Adénosine (Mono-/Di-/)Tri-Phosphate

AMPc : AMP cyclique

AMPc-PK : Protéines kinases dépendantes d'AMP cycliques

AVC : Accident vasculaire cérébral

Ca²⁺ : Ion calcium

CD 16 : Fc γ RIII

CD62 : Sélectine P

CMH: Cardiomyopathie hypertrophique

CPT : Citrate de trisodium, pyridoxal-5' phosphate et Tris

CTAD : Citrate, theophylline, adénosine, dipyridamole

DAG : Diacyglycérol

DPH : 1,6-diphenyl-1,3,5-hextriene

ENVT : École nationale vétérinaire de Toulouse

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

FEG : Facteur d'échange de nucléotide guanine

GMP, GDP, GTP : Guanine (Mono-/Di-/)Tri-Phosphate

GMPc : GMP cyclique

GMPc-PK : Protéines kinases dépendantes de GMP cycliques

GP : Glycoprotéine

Ig : Immunoglobuline

IP : Prostacycline lié à la protéine G

IP3 : Inositol triphosphate

ITIM : Immuno-tyrosine based inhibition motifs

Mg²⁺ : Magnésium

MgSO₄ :Sulfate de magnésium

MgCl₂ :Chlorure de magnésium

MIDAS : Metal ion dependent adhesion site

MPC : Mean platelet component
NO : Monoxyde d'azote
PAR : Récepteurs activés par des protéases
PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule
PGI₂ : Prostacycline
PI3K : Phosphoinositol 3-kinase
PIP₂ : Phosphoinositol
PKC : protéine kinase C
PLC β : Phospholipase C beta
PLC γ 2 : Phospholipase C gamma-2
PPACK : D-Phenylalanyl-prolyl-arginyl Chloromethyl Ketone
PRP : Platelet rich plasma
PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand-1
RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G hétérodimériques
RIAM : Rap1-guanosine triphosphate-interacting adaptor molecule
ROCK : Protéines kinases associées à rho
TNF α : Facteur de nécrose tumorale α
TSP : thrombospondine
TXA₂ : Thromboxane A₂
VPM : Volume plaquettaire moyen
vWF : Facteur de von Willebrand

INTRODUCTION

Les plaquettes sont les principales cellules impliquées dans l'hémostase. Ce sont des cellules anucléées chez les mammifères (à la différence des reptiles et des oiseaux) qui s'activent lorsqu'une brèche se crée au sein du réseau vasculaire. Elles jouent également un rôle dans l'inflammation, les maladies cardio-vasculaires et les maladies néoplasiques.

La numération plaquettaire, le volume plaquettaire moyen (VPM), et le plaquettocrite sont des outils intéressants pour le clinicien dans de nombreux contextes. Ces données sont rapidement accessibles en médecine vétérinaire grâce aux analyseurs présents dans la plupart des cliniques. Cependant, les conditions pré-analytiques et analytiques sont susceptibles d'influencer la numération plaquettaire et l'obtention d'un spécimen sanguin de bonne qualité, par exemple pour la réalisation d'une analyse hématologique peut s'avérer compliquée en routine.

Le stress des animaux lors du prélèvement est notamment un facteur susceptible d'influencer la qualité des résultats et est souvent difficilement contrôlable par l'opérateur.

Afin de limiter au maximum les erreurs pré-analytiques, il est nécessaire de suivre certaines recommandations : les vaisseaux endommagés sont à proscrire [1], le volume prélevé doit respecter le rapport anticoagulant/sang, le tube doit être rempli en une fois et être rapidement homogénéisé. Malgré l'absence de données en médecine vétérinaire sur ce sujet il est conseillé de ne pas utiliser d'aiguille de trop petit diamètre et de n'effectuer qu'une dépression faible en utilisant une seringue, comme recommandé en biologie médicale humaine [2]. La présence de micro caillots au sein du tube peut passer inaperçue si les spécimens ne sont pas examinés très soigneusement et peut mener à une numération plaquettaire faussement diminuée.

Les erreurs analytiques sont plus spécifiques à certaines espèces. Dans l'espèce féline, les plaquettes ont une taille importante (12,1-15,1fL contre 5,4-9,2 fL chez le chien [3]) et de petites hématies (39,0-55,0fL contre 60,6-77,0fL chez le chien [3]). L'étendue de taille des plaquettes et celui des hématies se recoupent donc souvent. Ainsi le comptage plaquettaire par impédance fondé uniquement sur la taille des cellules est peu fiable, notamment chez le chat [4]. Les automates utilisant la cytométrie de flux analysent la structure interne des cellules en plus de leur taille ce qui permet de différencier pour une même taille les plaquettes des hématies. Mais, l'erreur la plus fréquente aboutissant à une pseudothrombopénie dans

l'espèce féline est la présence d'agrégats plaquettaires et ne dépend pas de la méthode d'analyse utilisée.

L'agrégation plaquettaire *in vivo* est une des étapes clés de la formation du clou plaquettaire lors de l'hémostase. L'adhésion des plaquettes aux protéines du sous endothélium (facteur de von Willebrand (vWF) et collagène principalement) exposées lors de brèche vasculaire provoque leur activation, leur changement de forme, ainsi que la sécrétion du contenu des granules et l'expression en surface de molécules pro-coagulantes [5]. Les plaquettes circulant dans la zone proche de la lésion endothéliale sont activées par l'augmentation de la concentration locale en molécules agonistes (ADP, thromboxane A₂, thrombine) qui interagissent avec différents récepteurs présents à leur surface. Ces interactions entraînent l'activation de voies de signalisation internes complexes permettant la mobilisation du calcium intracellulaire. Ce phénomène aboutit notamment à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, récepteur permettant l'agrégation plaquettaire via la formation de ponts de fibrinogène entre les plaquettes [5]. Des mécanismes modulateurs de l'activation et de l'agrégation plaquettaire existent et font intervenir notamment des prostaglandines et le monoxyde d'azote (NO) [6].

L'agrégation plaquettaire est un phénomène indispensable *in vivo* pour le bon déroulement de l'hémostase mais représente *in vitro* un obstacle majeur pour l'exploration de l'hémostase et les analyses hématologiques. Les mécanismes en jeu dans l'agrégation *in vitro* ne sont pas encore totalement élucidés mais sont très probablement similaires à ceux en action dans l'agrégation *in vivo*. Bien que toutes les espèces dont l'Homme soient sujettes au phénomène d'agrégation plaquettaire *in vitro*, certaines, comme le Chat, y sont particulièrement sensibles. Cette sensibilité des plaquettes félines à l'agrégation serait notamment liée à leur grande taille, leur sensibilité à des molécules telles que l'adrénaline [7], la possibilité d'induire une agrégation plaquettaire par de faibles concentrations d'ADP, la concentration élevée en sérotonine dans les granules denses, l'agrégation irréversible et la sécrétion des granules en réponse à la sérotonine [4,8].

La présence d'agrégats plaquettaires empêche de dénombrer les plaquettes. En effet, il est impossible de dénombrer les plaquettes présentes dans les agrégats que ce soit visuellement sur un frottis ou à l'aide d'automates d'hématologie. La présence d'agrégats plaquettaires entraîne donc des pseudothrombopénies par sous estimation de la numération plaquettaire et parfois une surestimation de la numération leucocytaire notamment lors d'utilisation

d'automates à impédance. Un comptage précis des plaquettes nécessite de s'affranchir de ce phénomène d'agrégation.

Cela représente un obstacle important en hématologie féline de routine car la prévalence est particulièrement élevée chez le chat avec l'utilisation d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA), l'anticoagulant de choix en hématologie : plus de 50 % sur 359 spécimens sanguins provenant de chats [4], 66.6% sur 48 chats sains sous anesthésie [9].

Certaines recommandations existent pour tenter de réduire la formation d'agrégats plaquettaires dans l'espèce féline mais toutes ne sont pas vérifiées par des études. Une ponction veineuse difficile est souvent considérée comme prédisposant à l'agrégation plaquettaire du fait de l'activation des plaquettes au site de ponction [4,10] mais la réalisation d'une ponction veineuse parfaite n'empêche pas la formation d'agrégats plaquettaires. De plus, *Riond et al* n'ont pas montré d'influence de la difficulté de réalisation du prélèvement sur la présence d'agrégats plaquettaires [11]. Dans tous les cas, une contention minimale et des conditions permettant de limiter au maximum le stress de l'animal sont recommandées. En effet, l'adrénaline sécrétée lors de stress bien que n'induisant pas à elle seule l'agrégation plaquettaire chez le chat potentialise l'agrégation induite par l'ADP, le collagène et la thrombine [12,13].

La veine jugulaire est généralement conseillée comme site de ponction sanguine chez le chat car le débit sanguin relativement faible limiterait l'activation plaquettaire, ceci n'est pas confirmé par l'étude de *Moritz et al.* qui ne montre pas de différence significative sur la présence d'agrégats plaquettaires entre une ponction à la veine céphalique et une ponction à la veine jugulaire [14].

Il est également recommandé de ne pas utiliser les premiers millilitres (2 à 5) de sang prélevés pour l'analyse des plaquettes car ils sont riches en plaquettes activées qui ont tendance à s'agréger [14]. Ce sang peut être récolté sur un autre tube et être utilisé pour d'autres analyses notamment sérologiques et biochimiques.

Il est généralement conseillé d'analyser le prélèvement rapidement pour limiter la formation d'agrégats plaquettaires. *Moritz et al.* préconisent de réaliser le comptage plaquettaire dans les 30 minutes suivant le prélèvement [14], *Weiser et al* dans l'heure [15], et *Knoll et al.* 4 à 6 heures après le prélèvement car les plaquettes ont tendance à s'agréger avec le temps [16]. Pour autant, *Norman et al.* n'ont pas montré de différence significative entre les spécimens analysés dans la foulée du prélèvement ou après envoi par la poste [4]. Ces différentes observations peuvent s'expliquer par le fait qu'une partie des agrégats plaquettaires qui se

forment dans l'espèce féline en présence d'EDTA est réversible et que la première apparition et le pic de présence d'agrégats est différent pour chaque individu [11]. Il peut donc être utile d'effectuer à nouveau l'analyse plusieurs heures après dans le cas de thrombopénie liée à la présence d'agrégats plaquettaires [11].

De nombreux anticoagulants ont été étudiés pour tenter de limiter ce phénomène, l'utilisation de CTAD (citrate, theophylline, adénosine, dipyridamole) seul ou en association à l'EDTA a montré des résultats très satisfaisants [17,18] mais se révèle difficile à utiliser en hématologie féline de routine notamment du fait de la nécessité de respecter et de prendre en compte le rapport de dilution de 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang. La prostacycline (PGI₂) et son analogue synthétique, l'iloprost, ont également montré des résultats encourageants [10] mais nécessitent pour les cliniciens de préparer leurs propres tubes car aucun tube de ce type n'est commercialisé à l'heure actuelle ce qui représente un obstacle important pour une utilisation en clinique vétérinaire.

Les propriétés antiagrégantes du magnésium sont connues depuis les années 1900, mais la commercialisation d'un tube à base de sulfate de magnésium ne date que de quelques années. Ce tube a montré des résultats intéressants dans le cas de pseudo-thrombopénies secondaires à la présence d'agrégats plaquettaires en médecine humaine. A l'heure actuelle aucune donnée sur l'efficacité du magnésium comme antiagrégant plaquettaire n'est disponible dans l'espèce féline.

Le présent travail reprend les données disponibles sur les propriétés antiagrégantes du sulfate de magnésium et son utilisation en hématologie humaine. La deuxième partie, expérimentale, est consacrée à l'étude du sulfate de magnésium comme antiagrégant dans l'espèce féline et son impact sur la prévalence d'agrégats plaquettaires.

**PREMIÈRE PARTIE (ETUDE
BIBLIOGRAPHIE) :**

**LE SULFATE DE MAGNÉSIUM, UN
ANTIAGREGANT PLAQUETTAIRE
INTÉRESSANT ET DISPONIBLE EN MÉDECINE
HUMAINE**

Le magnésium joue de nombreux rôles au sein de l'organisme. Il agit comme cofacteur pour plus de 300 enzymes permettant de réguler un grand nombre de fonctions fondamentales comme la contraction musculaire, la conduction neuromusculaire, le contrôle de la glycémie, la contraction myocardique, la pression artérielle, et l'agrégation plaquettaire [19,20]. Il joue également un rôle dans la production d'énergie en conditions aérobie et anaérobie, participe à la structure des protéines, acides nucléiques et des mitochondries, permet le transport transmembranaire d'ions calcium et potassium, régule la migration et l'adhésion cellulaire, et est indispensable pour la synthèse d'acides nucléiques [20].

1. Les propriétés antiagrégantes plaquettaires du magnésium

Les propriétés antiagrégantes du magnésium sont connues depuis les années 1900 [22] et les sels de magnésium étaient utilisés pour le comptage plaquettaire jusque dans les années 1950 [23]. A cette époque, les sels d'EDTA sont introduits dans les laboratoires d'hématologie et s'installent rapidement comme anticoagulant de choix en hématologie [23]. Les propriétés antiagrégantes du magnésium sont alors laissées de côté et le sulfate de magnésium n'est plus utilisé en hématologie jusqu'à la commercialisation du tube ThromboExact®, il y a une dizaine d'années. Bien que le sulfate de magnésium ait été longtemps laissé de côté en hématologie, ses effets antiagrégants ont été étudiés et exploités in vivo dans diverses affections.

1.1. Les mécanismes de l'activation et de l'agrégation plaquettaire

Afin de comprendre les mécanismes à l'origine des propriétés antiagrégantes du sulfate de magnésium, il est nécessaire de comprendre les mécanismes d'activation et d'agrégation des plaquettes. Ce paragraphe reprend les éléments importants concernant les plaquettes et leurs mécanismes d'activation et d'agrégation.

1.1.1. Bref rappel sur l'anatomie des plaquettes

Les plaquettes sont les plus petites cellules sanguines circulantes. Ce sont des fragments cytoplasmiques anucléés produits à partir du cytoplasme des mégacaryocytes, de grandes cellules plurinucléées issues de la différenciation de cellules souches myéloïdes. Un

mégacaryocyte peut produire 2000 à 8000 plaquettes en 12 heures. Les plaquettes au repos ont une forme discoïde de quelques micromètres de diamètre plus ou moins sphérique avec de fines granulations contenant des molécules impliquées dans les phénomènes d'activation, d'adhésion et d'agrégation des plaquettes. Elles ont une durée de vie faible et relativement égale chez toutes les espèces (5 à 7 jours), elles sont phagocytées par les macrophages de la rate et du foie.

Elles sont composées :

- d'une membrane plasmique qui comprend notamment des récepteurs comme des glycoprotéines qui jouent un rôle majeur dans l'activation des plaquettes ainsi que des phospholipides, cholestérol, glycolipides responsables de la structure membranaire. Le système canaliculaire ouvert constitue une surface de contact importante avec l'environnement et forme une réserve de membrane mobilisable pour le changement de forme [24].

- d'organites comme des mitochondries, le réticulum endoplasmique correspondant aux réserves intracellulaires de calcium, des grains de glycogène et des granules de stockage. Il existe notamment les granules de stockage α qui sont les plus abondants et contiennent principalement des glycoprotéines adhésives, des facteurs de coagulation et des facteurs de croissance, et les granules denses δ qui contiennent du magnésium et de nombreux facteurs pro-agrégants et pro-coagulants comme l'ADP, l'ATP, le Ca^{2+} , et l'épinéphrine. Les granules λ contiennent eux de nombreuses protéases. [24]

- d'un cytosquelette composé de microtubules qui maintiennent la forme au repos et d'actomyosine. L'activation des plaquettes entraîne des remaniements du cytosquelette à l'origine de la sécrétion des granules et de changements de forme de la cellule.

1.1.2. Les récepteurs membranaires activent différentes voies de signalisation

La membrane plasmique des plaquettes contient de nombreux récepteurs différents impliqués dans l'activation des plaquettes. Chaque récepteur a une affinité particulière pour chaque ligand et un récepteur peut interagir avec plusieurs ligands et inversement. Il existe plusieurs familles de récepteurs au niveau des plaquettes (*Tableau 1*) :

Les intégrines

Ce sont des protéines hétérodimériques impliquées dans l'adhésion des plaquettes, il en existe 6 types différents. Leurs ligands sont principalement des molécules présentes dans le sous-endothélium (collagène, fibrinogène, vWF, laminines). La liaison du ligand avec l'intégrine nécessite une activation préalable de cette dernière qui correspond au passage d'une conformation conférant peu d'affinité envers le ligand à une conformation conférant une forte affinité. L'ensemble des signaux aboutissant à l'activation des intégrines correspond à la signalisation « inside-out ». Les 2 principales intégrines plaquettaires sont $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_2\beta_1$. La première est la plus importante et la plus présente des intégrines [25], elle interagit principalement avec le fibrinogène et permet l'adhésion et l'agrégation des plaquettes, la sécrétion des granules et le changement de forme, la deuxième permet l'adhésion des plaquettes via une interaction avec le collagène. La liaison du ligand à l'intégrine déclenche ensuite une signalisation dite « outside-in ».

Les récepteurs avec répétitions riches en leucine

Le principal est le complexe glycoprotéique GPIb-IX-V qui interagit principalement avec le vWF lui-même lié ou non au collagène [26]. L'interaction entre le vWF et le GPIb-IX-V est rapidement réversible ce qui permet notamment aux plaquettes de rouler sur la surface endothéliale et augmente ainsi l'interaction des autres récepteurs à leurs ligands (notamment GPVI avec le collagène) [27]. Les signaux transmis suite à l'interaction protéine-ligand aboutissent à l'activation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire via notamment l'activation de la phospholipase C gamma-2 (PLC γ 2) et la stimulation de la synthèse de thromboxane A₂. La phosphoinositol 3-kinase (PI3K) est liée au complexe GPIb-IX-V dans les plaquettes au repos [28] et est impliquée dans la signalisation inside-out vers l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [29].

Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines

Le principal récepteur de cette famille est le GPVI qui interagit avec le collagène en conformation triple hélice [30]. La liaison du ligand à ce récepteur entraîne une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de PI3K, PLC γ 2 et la petite protéine G Rac1 [5].

Les récepteurs couplés aux protéines G hétérodimériques (RCPG)

Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires qui possèdent une forte affinité pour leurs ligands. Ils sont couplés aux protéines G qui sont des hétérodimères constitués de 2 sous-unités α et $\beta\gamma$, maintenus en conformation inactive par la liaison d'un groupement GDP à la

sous-unité G_{α} . La liaison du ligand à son récepteur permet à ce dernier d'agir comme facteur d'échange de nucléotide guanine (FEG) provoquant la substitution du GDP au niveau de la sous-unité G_{α} par du GTP [31]. L'activité FEG de ces récepteurs leur permet d'interagir avec de nombreuses sous-unités de protéines G ($G_{12/13}$, G_q , G_i) permettant d'activer plusieurs voies de signalisation simultanément aboutissant à une amplification ou une inhibition du signal [5]. Parmi cette famille de récepteurs, on trouve entre autres les récepteurs activés par des protéases (PAR), les récepteurs à l'ADP, et les récepteurs des prostaglandines (*Figure 1*).

- Les PAR sont des récepteurs activés suite au clivage de l'extrémité N-terminale par des protéases (principalement la thrombine) [32]. Il en existe de 4 types chez l'Homme (PAR1-4). Chez l'Homme comme chez le chien [33], les deux principaux types impliqués dans la réponse des plaquettes à la thrombine sont PAR1 qui provoque une augmentation rapide de la concentration calcique intracellulaire en réponse à de faibles concentrations de thrombine et PAR4 qui provoque une augmentation plus lente et prolongée [34]. La transduction du signal fait ensuite intervenir les protéines $G_{12/13}$ et G_q (*Figure 1*) et aboutit à la dégranulation des plaquettes, l'activation des intégrines et l'agrégation plaquettaire. Suite au clivage et à la transduction du signal, les PAR sont internalisés et détruits. Aucun stock de PAR n'est disponible dans les plaquettes ce qui fait que les plaquettes ne peuvent réagir qu'une fois à la thrombine [5].
- Il existe 2 récepteurs à l'ADP chez l'Homme, $P2Y_{12}$ et $P2Y_1$. La liaison de l'ADP sur son récepteur $P2Y_{12}$ entraîne d'une part l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) et donc la diminution de concentration intracellulaire en AMPc par activation de la sous-unité protéique $G_{\alpha i2}$ [35] et d'autre part, l'activation de PI3K par activation de la sous-unité $G_{\beta\gamma}$. Les $P2Y_{12}$ amplifient également la mobilisation de calcium induite par les $P2Y_1$ bien que le mécanisme ne soit pas totalement élucidé.
Les récepteurs $P2Y_1$ sont 10 fois moins nombreux que leurs homologues $P2Y_{12}$ [36]. Ils jouent un rôle dans le changement de forme et dans l'agrégation plaquettaire transitoire et réversible induite par l'ADP [38] et font intervenir les protéines G_q aboutissant à l'activation de phospholipase C beta ($PLC\beta$) et les protéines $G_{12/13}$ aboutissant à l'activation des protéines kinases associées à rho (ROCK) (*Figure 1*) [39]. Après activation, les récepteurs $P2Y_{12}$ s'internalisent et sont finalement recyclés vers la membrane plasmique, à la différence des RAP [40].
- Les principaux récepteurs des prostaglandines sont les récepteurs TP_{α} et TP_{β} qui interagissent avec le TXA2 et les récepteurs à la PGI2 lié à la protéine G (IP). La

liaison du TXA2 à ses récepteurs participe à l'agrégation plaquettaire via la protéine G_q et au changement de forme via une interaction avec la protéine $G_{12/13}$ [41]. Chez de nombreux chiens, le TXA2 ne déclenche pas l'agrégation plaquettaire [42], contrairement au chat [43]. La PGI2 est un puissant agent vasodilatateur et antiplaquettaire produit par les cellules endothéliales. Elle inhibe l'activation plaquettaire induite par le collagène, la thrombine, l'ADP et le TXA2 et est capable de dissoudre les agrégats déjà formés [44]. La liaison de PGI2 à son récepteur entraîne l'augmentation d'AMPc via l'activation de la protéine G_s (*Figure 1*). L'AMPc induit la phosphorylation de protéines clés inhibant notamment la sécrétion des granules, et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [5].

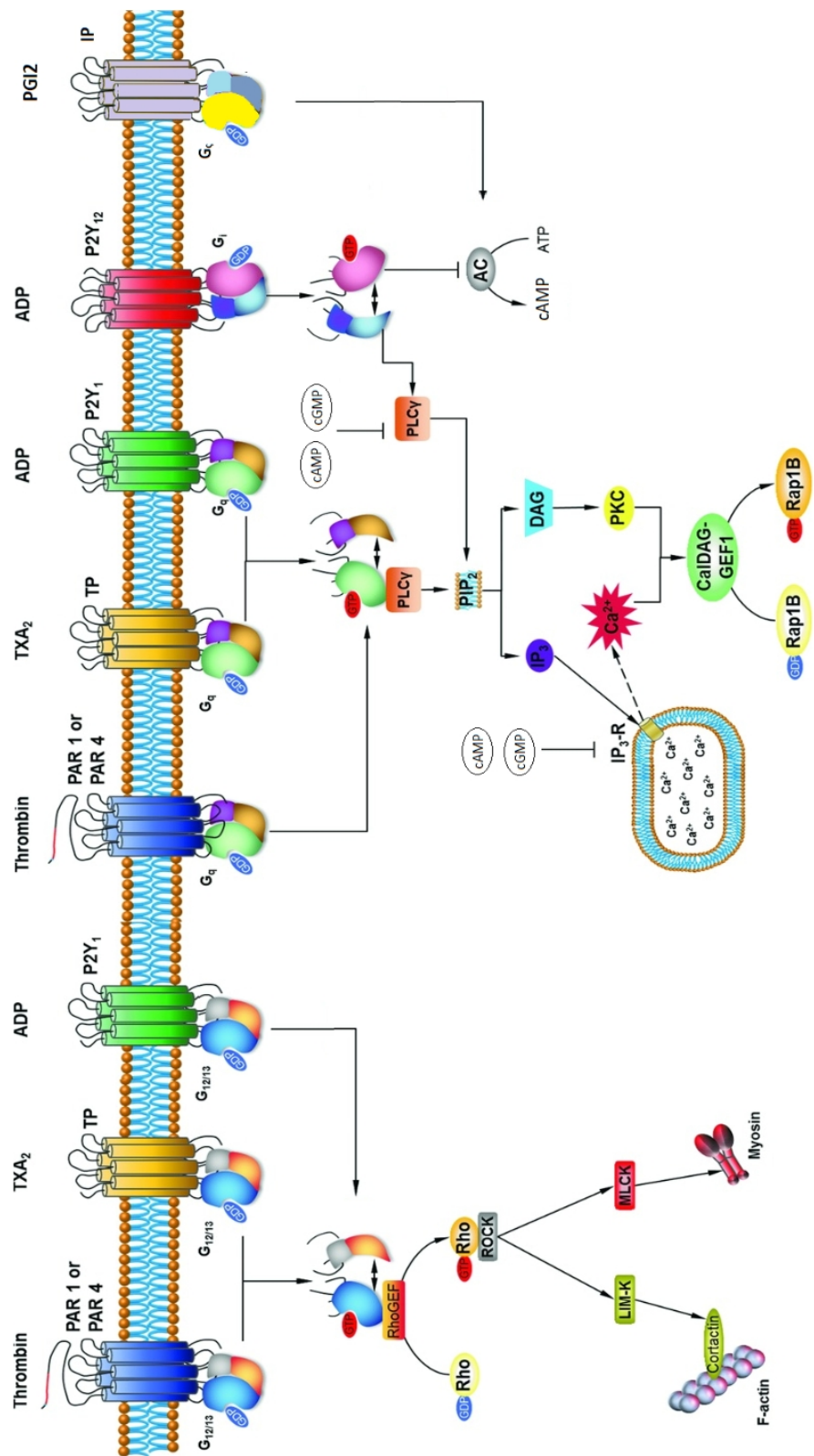


Figure 1 : Les voies de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), d'après Goggs et al. [5]

Famille de récepteur	Sous-type	Récepteur	Autres noms	Ligand(s)
Intégrine	β1	α2β1	GpIaIIa, VLA2, CD ₃₁ /CD ₃₅	Collagène
		α5β1		Fibronectine
		α6β1		Laminine
	β2	αIβ2		?
	β3	αIIbβ3	GpIIbIIIa, CD ₃₁ /CD ₆₁	Fibrinogène, VWF, fibrine
αVβ3			Vitronectine	
LRR		GP1b-IX-V complex	CD ₃₁	VWF, collagène, P-sélectine
		TLR2		Lipopeptides, acide lipothéchoïque
		TLR4		LPS, Fibrinogène
		TLR9		oligodésoxynudéotides CpG
Récepteurs couplés aux protéines G	Récepteurs à la thrombine	RAP1		Thrombine
		RAP2		Protéases liées à la trypsine
		RAP3		Thrombine
		RAP4		Thrombine
	Récepteurs à l'ADP	P ₂ Y ₁		ADP
		P ₂ Y ₁₂		ADP
	Récepteurs des prostaglandines	TXA ₂	PGH ₂	TXA ₂
		PGI ₂		PGI ₂
		PGE ₂		PGE ₂
	Récepteurs lipidiques	PAF		PAF
	Récepteurs de chimiokines	CXCR ₁		Facteur 1 dérivé des cellules stromales
		CCR1, CCR3		RANTES
		CCR4		Chimiokines dérivés des monocytes
	Autres	V _{1a}		Vasopressine
		A _{1a}		Adénoside
B2 adrénergique			Epinéphrine, norépinéphrine	
5-HT _{2A}			Sérotinine	
Superfamille des immunoglobulines		GPVI		Collagène (avec FcRγ)
		FcγRIIA		
		FcεRI		
	Molécules d'adhésion	JAM-1	F11	?
		JAM-3		Mac-1 dérivé des leucocytes
		ICAM-2		Intégrines β2
		PECAM-1		PECAM-1
	CD ₃₁			
Récepteur des lectines type C	P-sélectine	CD ₆₂ P		
Récepteurs TK	TPO-R	c-mpl, CD ₁₁₀	TPO	
Glycoprotéines	PSGL-1	CD ₆₂ L	Sélectine P de leucocytes	
	Ligand CD ₆₁	CD154	CD ₆₁	

Tableau 1 : Liste des récepteurs membranaires des plaquettes d'après Goggs et al. [5]

1.1.3. L'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ permet la fixation du fibrinogène, étape clé de l'agrégation

L'ensemble des signaux intracellulaires aboutissant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ correspond aux signaux dits inside-out. La signalisation inside-out est initiée par la liaison de protéines du sous endothélium aux récepteurs GPVI et GPIb-IX-V, par le clivage des PAR par la thrombine, et par la stimulation autocrine et paracrine des récepteurs à l'ADP et aux prostaglandines.

Ces différentes voies de signalisation font toutes intervenir l'activation de PLC aboutissant à la formation d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) à partir d'un phospholipide membranaire, le phosphoinositol (PIP2) (*Figures 1, 2*). L'IP3 se lie ensuite à ses récepteurs qui sont des canaux calciques situés au niveau du réticulum endoplasmique permettant la translocation du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique vers le cytoplasme, aboutissant à une augmentation transitoire de la concentration calcique intracellulaire (*Figure 2*) [5]. Cette baisse de concentration calcique au sein du réticulum endoplasmique active un capteur calcique (STIM-1) présent au niveau de sa membrane qui active à son tour des canaux calciques (Orai-1) situés au niveau de la membrane plasmique permettant l'entrée de calcium extracellulaire et renforçant ainsi la concentration calcique intracellulaire (*Figure 2*) [45].

L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire et la présence de protéine kinase C (PKC) - activée par la présence de DAG, stimulent l'activité du facteur d'échange de nucléotide guanine CalDAG-GEFI [46] qui active une protéine liée à la membrane plasmique, la Rap1B [47]. Une fois activée, la Rap1B recrute la protéine RIAM, une protéine capable de se lier à la Rap1B et à la taline-1. Le recrutement de RIAM au niveau de la membrane plasmique permet donc à la taline-1 d'être proche de la membrane plasmique et d'interagir avec le domaine libre cytoplasmique de la sous-unité β_3 de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [48] (*Figure 2*). L'interaction de la taline-1 avec la sous-unité β_3 est indispensable au changement de conformation de l'intégrine vers une forme conférant une forte affinité pour le fibrinogène mais elle n'est pas suffisante. La Kindlin-3 est une autre protéine qui se lie à la sous-unité β_3 et est indispensable à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et l'agrégation des plaquettes au même titre que la taline-1 [49], mais les mécanismes en jeu dans la coopération de ces deux protéines restent méconnus [5]. En parallèle, les protéines ROCK activées par la voie de la protéine $G_{12/13}$ participent au changement de forme des plaquettes en permettant le remodelage

du cytosquelette, et à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la sécrétion des granules en activant une PKC [50].

Il existe également une signalisation inside-out différente aboutissant à l'activation de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ suite à la liaison du collagène sur le récepteur GPVI [51].

L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium joue également un rôle majeur dans la sécrétion des granules et stimule la pompe Na^+/H^+ à l'origine d'une alcalinisation du milieu intracellulaire, et la phospholipase A2 qui catalyse le relargage d'acide arachidonique. L'acide arachidonique est alors transformé en prostaglandine H2 (par la prostaglandine G/H) elle-même ensuite transformée par la thromboxane synthétase en TxA2 [5]. Le TxA2 est relargué à l'extérieur de la cellule et amplifie l'activation des plaquettes via son action sur les récepteurs TP.

La liaison des ligands à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est l'étape clé de l'agrégation, elle permet l'interaction des plaquettes entre elles via la formation de ponts de fibrinogène et ainsi la formation d'agrégats [10] (*Figure 3*). Elle entraîne également des réarrangements du cytosquelette permettant la sécrétion du contenu des granules et le changement de forme avec l'émission de filopodes et lamellipodes via des voies de signalisation complexes. La sécrétion du contenu des granules permet la stimulation autocrine et paracrine des plaquettes par augmentation de la concentration en agonistes solubles dans l'environnement.

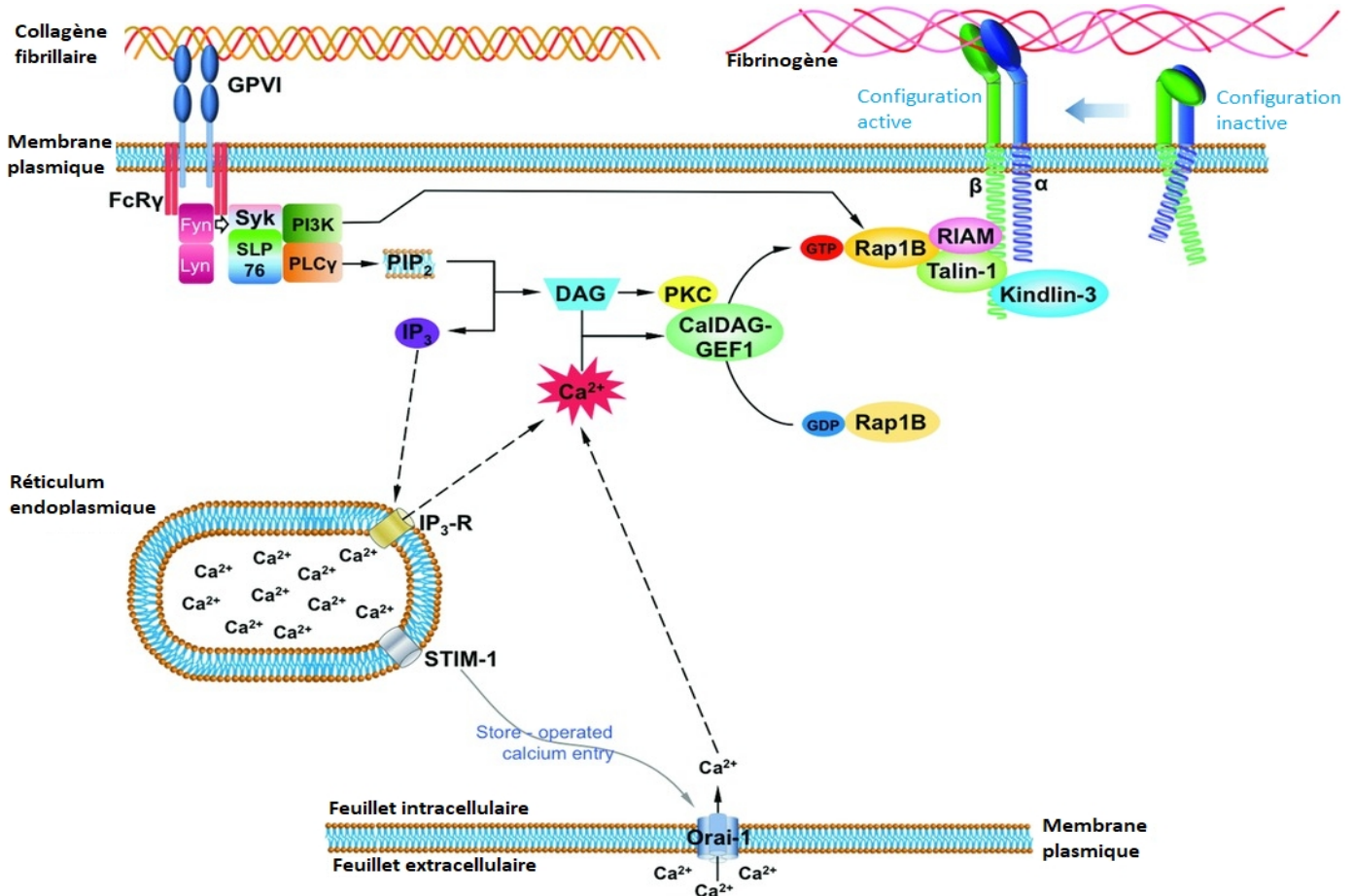


Figure 2 : L'augmentation de la concentration calcique permet l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, d'après Goggs et al. [5]

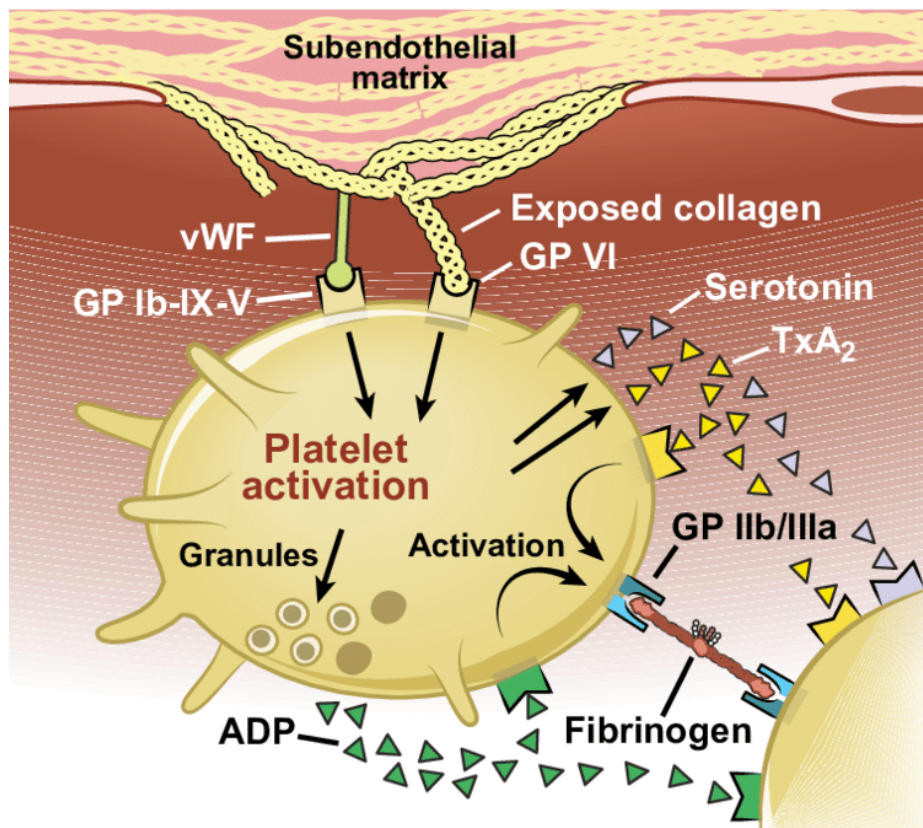


Figure 3 : Résumé des mécanismes de l'agrégation plaquettaire [118]

1.1.4. Des mécanismes inhibiteurs régulent l'activation plaquettaire

Les plaquettes sont capables de s'activer pour colmater des brèches au sein du réseau vasculaire, mais en l'absence de lésion endothéliale, elles sont maintenues au repos par des voies inhibitrices. Ces voies inhibitrices permettent également de juguler les phénomènes d'activation et d'agrégation plaquettaire et limiter la taille des thrombi. Les récepteurs de la prostacycline (PGI₂) ainsi que des immuno-récepteurs à motifs ITIM (immuno-tyrosine based inhibition motifs) (PECAM) [52] régulent le niveau d'inhibition des plaquettes circulantes. De même, le monoxyde d'azote (NO) produit au niveau de l'endothélium inhibe les plaquettes en stimulant une guanylate cyclase et la production de GMP cyclique.

Les nucléotides cycliques AMPc ou GMPc interfèrent à de nombreuses étapes de l'activation des plaquettes (*Figure 1*). Ils agissent principalement via des protéines kinases dépendantes de nucléotides cycliques (AMPc-PK, GMPc-PK). L'AMPc-PK et le GMPc-PK empêchent l'augmentation de la concentration calcique via l'inhibition des réactions catalysées par les PLC, ils interfèrent aussi au niveau des récepteurs IP₃ en catalysant leur phosphorylation mais les mécanismes en jeu sont méconnus [53]. Ils sont également capables de phosphoryler le récepteur du TxA₂ l'empêchant de se lier aux protéines G et de les activer [54], et de phosphoryler des protéines clés impliquées dans les réorganisations du cytosquelette [53].

1.2. Les différents effets du sulfate de magnésium sur les plaquettes

Le magnésium possède des propriétés antiadhésives et antiagrégantes sur les plaquettes chez l'Homme. L'ajout de MgSO₄ ou MgCl₂ [57, 58] *in vitro* inhibe la formation d'agrégats plaquettaires de façon dose-dépendante en réponse à l'ADP, la thrombine, le collagène [58-62] le TxA₂ [63] et l'épinéphrine [64]. L'inhibition de l'agrégation plaquettaire est visible dès 0,3-1 mmol/L [65] et la réponse est dose-dépendante [58-62]. La présence de MgSO₄ inhibe également l'adhésion *in vitro* des plaquettes au repos au fibrinogène [61]. Ces effets antiagrégant et antithrombotique sont également visibles *in vivo* suite à l'administration de MgSO₄ par voie orale ou intraveineuse [55, 62-66]. Chez l'Homme, l'hypomagnésémie est associée à une hyperréactivité des plaquettes [56]. Plusieurs mécanismes d'action du MgSO₄ sont suspectés comme étant à l'origine de ces propriétés.

1.2.1. Le magnésium agit sur la membrane plasmique des plaquettes

Le 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) est une des sondes les plus utilisées en polarisation de fluorescence. C'est un marqueur fluorescent qui s'incorpore dans les membranes et dont un petit déplacement de son axe de symétrie entraîne une dépolarisation de l'émission de fluorescence. L'utilisation de plaquettes marquées au DPH a montré que Mg^{2+} est capable d'interagir avec la membrane plasmique des plaquettes. L'ajout de $MgSO_4$ (1,5mmol/L) à une suspension de plaquettes à $4,5 \cdot 10^8$ plaquettes/mL obtenue à partir de PRP (platelet rich plasma), augmente significativement l'intensité de la fluorescence liée au DPH ce qui suggère que le magnésium agit sur la fluidité membranaire [57]. On peut donc penser que le magnésium peut moduler l'effet des agonistes plaquettaires agissant sur des récepteurs transmembranaires, en modifiant ces récepteurs au sein de la membrane. Par ailleurs, lors de l'activation de certains de ces récepteurs, il y a rapprochement de certains d'entre eux voire parfois dimérisation, mécanisme nécessaire à la transduction du signal [5]. Ces mécanismes pourraient donc être perturbés par le magnésium.

En revanche, la présence de $MgSO_4$ (3mmol/L) n'augmente pas l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) suggérant que le $MgSO_4$ n'influe pas sur la perméabilité membranaire [57].

1.2.2. Le magnésium régule l'activité des intégrines via les sites MIDAS

Les intégrines présentent des sites d'adhésion dépendant d'ions métalliques (Metal ion dependent adhesion site MIDAS ou MIDAS-like) au niveau de leurs sous-unités α et β [67]. Ces sites sont des sites de fixation du ligand dont la structure est influencée par la présence de cations divalents. Les cations peuvent stimuler ou inhiber la fixation du ligand.

a) Le magnésium stimule la liaison du collagène à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ chez l'Homme

Les plaquettes peuvent se lier au collagène via différents récepteurs (GPVI, GPIV, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$) suivant le type de collagène [68]. Le GPVI se lie uniquement à la forme fibrillaire du collagène tandis que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ se lie également au collagène monomérique de type I, III et IV [5, 69]. La liaison du collagène à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ permet l'adhésion des plaquettes mais n'entraîne pas la sécrétion des granules [69].

Chez l'homme, la présence de certains cations divalents (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , ou Co^{2+}) est nécessaire pour la liaison de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ au collagène fibrillaire ou monomérique [69, 70]. A l'inverse, le Ca^{2+} inhibe la stimulation de l'adhésion des plaquettes au collagène par Mg^{2+} [69].

Chez le lapin, l'adhésion des plaquettes au collagène est indépendante de la présence de Mg^{2+} ce qui suggère que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ ne participe pas à la liaison des plaquettes au collagène dans cette espèce [71]. La présence ou l'absence de l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ dans cette espèce n'a pas été objectivée et aucune donnée à ce sujet n'a été trouvée dans la littérature concernant l'espèce féline.

Le GPVI ne présente pas de site MIDAS, sa liaison au collagène ne dépend donc pas de la présence de cations divalents.

b) Le magnésium participe à la structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ chez l'Homme

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ possède un motif MIDAS au centre du domaine β , entouré par 2 autres sites dépendant d'ions métalliques, notamment Ca^{2+} (SyMB et ADMIDAS) [72,73]. Le motif MIDAS est chargé en Mg^{2+} préalablement à la liaison du ligand à l'intégrine [72] et y participe en interagissant avec le groupement carboxyle du ligand [73]. L'électrophilie de l'ion Mg^{2+} est augmentée en conformation active de l'intégrine ce qui augmente l'affinité pour le ligand [73].

Au niveau de la sous-unité IIb, on retrouve 4 sites occupés en conditions physiologiques par le Ca^{2+} . La liaison du Ca^{2+} au niveau des 4 sites permet une liaison optimale au fibrinogène et la présence de Mg^{2+} en grande quantité inhibe la liaison du Ca^{2+} au niveau de ces sites par compétition [74].

1.2.3. Le magnésium inhibe la mobilisation intracellulaire de calcium

La présence de magnésium in vitro inhibe la mobilisation intracellulaire de calcium qui joue un rôle majeur dans la synthèse de TXA2 et l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [57, 60]. Cet effet est probablement secondaire à l'inhibition du métabolisme des phosphoinositiques et notamment IP3 [57, 58]. De plus, Mg^{2+} inhibe l'entrée de Ca^{2+} dans le cytoplasme depuis le milieu extracellulaire, il agit probablement directement au niveau des canaux calciques membranaires par compétition pour les sites de liaison [75]. Le blocage de la mobilisation intracellulaire de calcium est au moins en partie à l'origine des propriétés antiagrégantes du

magnésium et implique le blocage des voies de signalisation en aval et donc l'inhibition de la synthèse de TxA2 [57, 60], de l'alcalinisation du milieu intracellulaire [58] et de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et de sa liaison au fibrinogène [57].

1.2.4. Le magnésium stimule la production d'AMPc

Hsiao et al. ont montré que l'addition de MgSO₄ limite la variation de pH consécutive à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire et que l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité de l'AMPc sur la protéine kinase A inhibe cet effet [58]. De plus, l'utilisation de MgSO₄ in vitro stimule de façon dose dépendante la production d'AMPc [57]. La stimulation de la production d'AMPc peut à elle seule expliquer les propriétés antiagrégantes du magnésium et ses effets sur l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium développés dans le paragraphe précédent. L'étude de l'agrégation plaquettaire en présence de magnésium et d'un inhibiteur de l'activité de l'AMPc permettrait de savoir si le magnésium inhibe l'agrégation uniquement via la stimulation de la production d'AMPc ou s'il agit également à d'autres endroits en aval des voies de signalisation. Nous n'avons pas trouvé d'information à ce sujet dans la littérature.

Le Mg²⁺ n'a pas d'influence sur la production de GMPc [57].

1.2.5. Le magnésium stimule la production de PGI2 par les cellules endothéliales

Le magnésium est utilisé en médecine humaine dans le traitement des infarctions myocardiques [64] et de la prééclampsie [76] notamment pour ses propriétés antiagrégantes. In vivo, le magnésium participe probablement aussi à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire indirectement, par son action sur l'endothélium. Le magnésium stimule la production de PGI2 par les cellules endothéliales ex vivo [76, 77]. Pour autant, l'administration de MgSO₄ n'entraîne pas d'augmentation de concentration de PGI2 au niveau systémique [64, 78].

Le magnésium ne stimule pas la production de NO par les plaquettes in vitro [57] et un traitement à base de MgSO₄ n'entraîne pas d'augmentation de concentration de NO in vivo [64]. En revanche, *Shechter et al.* ont montré que l'hypomagnésémie diminue le relargage de NO par les cellules endothéliales coronaires [63].

2. L'intérêt de l'utilisation du tube ThromboExact® en médecine humaine

Le magnésium a été laissé de côté en hématologie pendant de nombreuses années suite à la découverte des sels d'EDTA qui se sont rapidement imposés comme anticoagulants de choix. La présence de pseudothrombopénies secondaires à la présence d'agrégats plaquettaires avec l'utilisation de sels d'EDTA bien que relativement rare chez l'Homme a motivé la recherche de nouveaux anticoagulants. Dans les années 1980, Mg^{2+} a été utilisé avec succès en tant qu'anticoagulant pour le comptage plaquettaire dans le cas de pseudothrombopénie induite par l'EDTA [79]. Dans les années 2000, il a été utilisé avec succès pour l'analyse hématologique de routine à l'aide d'automates [80]. Pour autant, il n'était pas utilisé en routine en hématologie notamment du fait de l'absence de tubes à base de Mg^{2+} disponibles. Les travaux de *Schuff-Werner et al.* ont motivé la commercialisation du tube ThromboExact® du laboratoire Sarstedt il y a quelques années [23]. Ce tube offre une réelle alternative pour le comptage plaquettaire en cas de pseudothrombopénie induite par de nombreux anticoagulants chez l'Homme.

2.1. Les pseudothrombopénies dépendantes des anticoagulants chez l'Homme

La pseudothrombopénie est un phénomène *in vitro* relativement rare chez l'Homme (touche 0,03-0,27% de la population générale) [81]. Ce phénomène s'explique par la présence d'agrégats plaquettaires qui se mettent en place *in vitro*, au sein de l'échantillon. Son identification par le praticien est importante afin de ne pas conclure faussement à une thrombopénie et ainsi éviter la réalisation ou la contre-indication inutiles d'examen complémentaires ou de traitements.

La pseudothrombopénie est généralement rapportée avec l'utilisation d'EDTA comme anticoagulant, on parle même de pseudothrombopénie EDTA-dépendante. Elle met en jeu des phénomènes immunologiques avec l'implication d'autoanticorps dont probablement des agglutinines froides, des anticorps antinucléaires et des immunoglobulines de type G principalement, mais aussi A et M [81].

La présence d'EDTA, un chélateur irréversible de Ca^{2+} , modifie la conformation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [81, 82, 83]. Ceci est très probablement en lien avec la présence de cations divalents (notamment Ca^{2+}) participant au maintien de la structure de l'intégrine via des interactions au niveau de sites de liaison comme expliqué dans le *paragraphe 1.2.2*. La présence d'EDTA induit donc un changement de conformation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui aboutit à l'exposition

d'épitopes cryptiques (*Figure 4*) [81, 82, 84]. Chez l'Homme, les personnes atteintes de pseudothrombopénie, ont un taux de certains anticorps circulants plus élevé que les individus sains, comme les agglutinines froides, et les anticorps antinucléaires dont l'origine reste encore méconnue mais qui peuvent être naturels ou acquis [81]. Les anticorps peuvent se lier aux épitopes exposés par l'EDTA qui forment des néoantigènes à la surface des plaquettes (*Figure 4*), et provoquer l'activation et l'agrégation des plaquettes via l'activation d'une tyrosine kinase [85] elle-même à l'origine de l'activation de la PLC γ notamment [5].

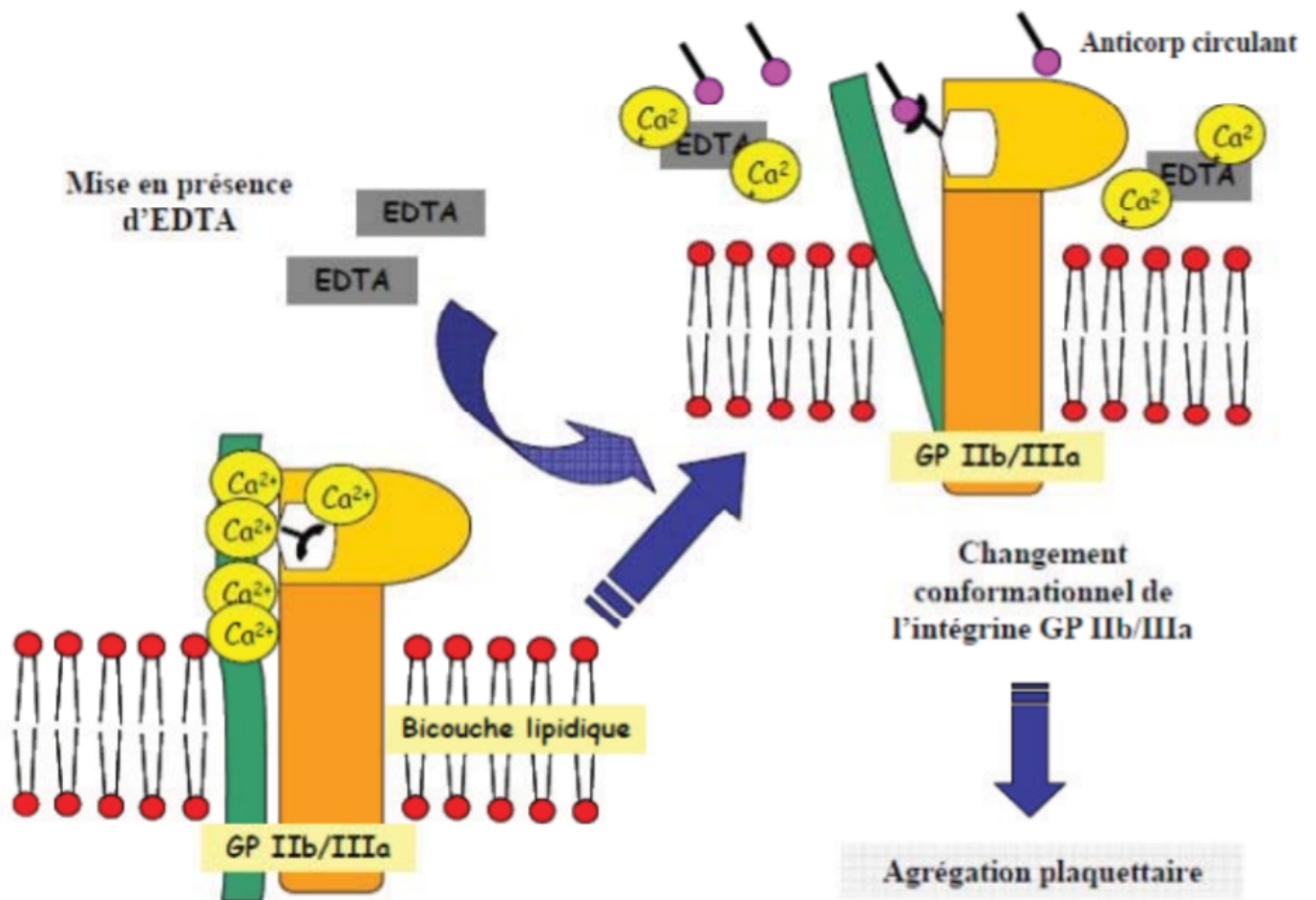


Figure 4 : Mécanismes d'activation de l'intégrine α IIb β 3 chez les personnes souffrant de PTCP EDTA-dépendante [119]

D'autres voies sont également susceptibles d'expliquer le phénomène de pseudothrombopénie. Les autoanticorps dirigés contre des phospholipides chargés négativement peuvent également se lier à des antigènes modifiés par l'EDTA et participer au phénomène d'agrégation [81, 86]. Des complexes immuns sont également susceptibles

d'interagir avec les récepteurs Fc et d'induire l'agrégation plaquettaire en présence d'EDTA [87].

D'autres anticoagulants sont susceptibles d'induire une pseudothrombopénie. Environ 20 % des patients présentant une pseudothrombopénie en présence d'EDTA en présente également une en présence de citrate [88]. L'héparine est également susceptible d'induire des pseudothrombopénies et n'est pas recommandée car elle entraîne la présence de halos autour des éléments cellulaires rendant l'interprétation au frottis difficile [81]. Chez certains individus on remarque la présence de pseudothrombopénies en présence de nombreux anticoagulants comme le citrate, l'héparine, le fluorure de sodium, l'hirudine ou l'oxalate de sodium [89-93]. Les mécanismes en jeu dans ces pseudothrombopénies sont méconnus.

La présence de pseudothrombopénies induites par de multiples anticoagulants chez certains individus a encouragé la recherche de nouveaux anticoagulants. Parmi eux, le CPT (citrate de trisodium, pyridoxal-5' phosphate et Tris) et le CTAD ont été utilisés, et aucun cas de pseudothrombopénie n'a été rapportée [81]. Mais le CPT n'est pas disponible en tube conditionné sur le marché, et le CTAD comme le citrate nécessite de respecter le rapport sang/ anticoagulant et de prendre en compte le facteur de dilution. L'acide citrate dextrose (ACD) semble également prévenir l'agrégation mais a été très peu étudié. [81]

2.2. Le tube ThromboExact® réduit l'agrégation plaquettaire dans le cas de pseudothrombopénie chez l'Homme

Dès les années 1980, le magnésium a prouvé son efficacité pour prévenir l'agrégation plaquettaire in vitro en cas de pseudothrombopénie induites par l'EDTA. [79] Il constituait alors une option possible en cas de pseudothrombopénie, disponible à relativement bas coût mais peu pratique étant donné l'absence de tube conditionné à base de Mg^{2+} .

Les résultats encourageants des travaux de *Schuff-Werner et al* en 2013 [23] ont motivé la commercialisation du tube ThromboExact® peu de temps après. Sur 44 patients souffrant de pseudothrombopénie induite par l'EDTA, aucun spécimen sanguin prélevé sur le tube ThromboExact® n'a présenté d'agrégats plaquettaires selon l'automate, ce qui a été confirmé au frottis. Chez tous les patients la numération plaquettaire mesurée par impédance est supérieure en présence de $MgSO_4$ par rapport à l'EDTA. De plus, 5 patients sur 10 ont également présenté des agrégats plaquettaires en présence de citrate, suggérant que le tube ThromboExact® peut inhiber la formation d'agrégats chez les patients souffrant de pseudothrombopénie induite par de multiples anticoagulants.

Sur 217 patients dont la présence d'agrégats plaquettaires a été préalablement objectivée par cytométrie de flux (signal « agrégats », ADVIA 2120) dans un spécimen sanguin recueilli sur EDTA, aucun spécimen recueilli sur tube ThromboExact® n'a révélé la présence d'agrégats par l'automate ou par observation directe sur le frottis. La numération plaquettaire était plus importante avec l'utilisation du tube ThromboExact® chez les patients avec une pseudothrombopénie importante avec formation d'agrégats de grande taille en présence d'EDTA. En revanche, pour des agrégats de petite taille, la numération plaquettaire reste plus élevée avec l'utilisation d'EDTA par rapport au tube ThromboExact® [94].

Une autre étude du même type a montré des résultats plus contrastés concernant la présence d'agrégats plaquettaires sur des spécimens recueillis sur des tubes à base de MgSO₄. Pour 4 spécimens sur 15, l'automate d'hématologie par impédance a rapporté la présence d'agrégats, confirmée par observation du frottis. Ces agrégats étaient cependant moins gros que ceux retrouvés dans les spécimens EDTA sur les mêmes sujets. Ces résultats s'expliquent probablement par l'utilisation d'un tube beaucoup moins concentré en MgSO₄ que le tube ThromboExact® [95].

Des cas plus isolés d'utilisation du MgSO₄ dans le cas de pseudothrombopénie ont également été rapportés. *Kohlschein et al* rapportent le cas d'une femme de 69 ans pour laquelle le comptage plaquettaire était de 35.10⁹/L avec la présence d'agrégats au frottis avec l'utilisation d'EDTA, de 45.10⁹/L sur citrate et de 253.10⁹/L sur ThromboExact® [96]. *Kovacs et al.* rapportent le cas d'un patient âgé qui présentait une pseudothrombopénie à 5 anticoagulants (EDTA, hirudine, héparine de lithium, citrate de sodium et oxalate de sodium), plus marquée avec l'utilisation d'EDTA. Avec l'utilisation de MgSO₄, le comptage plaquettaire était significativement plus élevé et ne diminuait pas avec le temps contrairement aux autres anticoagulants [97].

L'utilisation du MgSO₄ semble également capable d'empêcher la formation d'agrégats chez les individus souffrant de pseudothrombopénie induite par l'Abciximab un antiagrégant plaquettaire utilisé en médecine humaine ayant une action dirigée contre l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ [98].

2.3. Influence du tube ThromboExact® sur les paramètres hématologiques

Afin de savoir si le tube ThromboExact® peut être utilisé en routine pour les analyses hématologiques sur des individus ne présentant pas de pseudothrombopénie, plusieurs auteurs se sont intéressés aux effets du MgSO₄ sur les différents paramètres hématologiques chez des individus sains.

2.3.1. Influence du tube ThromboExact® sur la numération plaquettaire

Schuff-Werner et al. ont montré sur 21 patients sains que la numération plaquettaire mesurée par impédance n'est significativement pas différente entre un tube EDTA et le tube ThromboExact®, bien que légèrement plus faible dans ce dernier (numération plaquettaire moyenne $220.1 \pm 15.3 \times 10^9/L$ sur tube ThromboExact® contre $257 \pm 18.7 \times 10^9/L$ sur tube EDTA) [23]. *François et al.* ont confirmé cette tendance plus tard la même année avec une étude sur 23 patients sains. La numération plaquettaire moyenne mesurée par cytométrie de flux était significativement plus élevée avec l'utilisation d'EDTA par rapport au tube ThromboExact® (respectivement $255.10^9/L$ [175–337] et $215.10^9/L$ [140–289]) [94]. Une autre étude portant sur 61 sujets sains a montré qu'indépendamment du temps de stockage, la numération plaquettaire est plus faible avec l'utilisation de $MgSO_4$ par rapport à l'EDTA mais que l'écart dépend de l'analyseur utilisé. Elle est plus faible de 15.4% à 18.9% pour le XE 5000 un analyseur utilisant la méthode par impédance, 5.2% à 7.6% pour le DxH 800 un autre analyseur utilisant la méthode par impédance, et 12.9% à 16.5% pour l'Advia 120 utilisant la cytométrie de flux. [99]

Mannuß et al. ont étudié les effets du délai avant analyse sur les paramètres plaquettaires de 21 patients ne présentant pas de pseudothrombopénie sur des spécimens sanguins récoltés sur EDTA, citrate et $MgSO_4$. Ils ont notamment montré que la numération plaquettaire augmente de $228,6 \pm 49 .10^9/L$ à $240,6 \pm 59 .10^9/L$ en 180 minutes sur les spécimens récoltés sur EDTA alors qu'elle est relativement stable pour les spécimens récoltés sur citrate et $MgSO_4$ (respectivement de $197,6 \pm 42 .10^9/L$ à $189 .10^9/L$ et de $201,6 \pm 41 .10^9/L$ à $206,6 \pm 42 .10^9/L$). Ils ont également montré que la numération plaquettaire moyenne mesurée par impédance était nettement moins élevée avec l'utilisation de $MgSO_4$ comme anticoagulant par rapport à l'EDTA (respectivement $190,6 \pm 42 .10^9/L$ et $217,6 \pm 49 .10^9/L$). Cette différence est bien moins importante avec l'utilisation de la cytométrie de flux ($228,6 \pm 54 .10^9/L$ pour l'EDTA et $223,6 \pm 53 .10^9/L$ pour le tube ThromboExact®). Ils ont ensuite confirmé sur 834 patients sains que la numération plaquettaire était significativement plus faible avec le tube ThromboExact® en utilisant la méthode par impédance qu'avec l'EDTA (respectivement $205.10^9/L$ [32, 642] et $243,6.10^9/L$ [32-769]). En utilisant la cytométrie de flux la différence n'était plus significative ($226,5.10^9/L$ [34-787] pour le tube ThromboExact® et $236,5.10^9/L$ [39-799] pour le tube EDTA) [22].

2.3.2. Influence du tube ThromboExact® sur le volume plaquettaire moyen

Le volume plaquettaire moyen (MPV) dépend de l'anticoagulant utilisé mais également de l'analyseur.

Le MPV mesuré par impédance (Coulter LH 750 et Sysmex XE 5000) est plus élevé en présence d'EDTA que de MgSO₄ (respectivement 10,6 fL et 9,6fL [23] ; 10,4fL et 9,5fL [99] ; 10,4fL et 9,31fL [22]). En revanche, le MPV mesuré par cytométrie de flux (Advia 2120, Advia 120) est moins élevé avec l'utilisation d'EDTA qu'avec le MgSO₄ (respectivement 8,5fL et 9,4fL [99] ; 8,6fL et 10,4fL [94]). Aucune hypothèse pour expliquer cette différence n'a été trouvée dans la littérature.

En présence d'EDTA, les plaquettes grossissent avec le temps et passent d'une forme discoïde à une forme sphéroïde aboutissant à une augmentation du MPV objectivable par impédance ou par cytométrie de flux [22, 99-101]. Ce phénomène est moins marqué avec l'utilisation de MgSO₄ comme anticoagulant. *Mannuß et al.* ont montré une augmentation du MPV de 9.31 ± 0.97 fL à 9.66 ± 1.06 fL après 180 minutes pour les spécimens récoltés sur tube ThromboExact® et une augmentation de 10.40 ± 1.18 fL à 11.12 ± 1.32 fL pour ceux récoltés sur tube EDTA [22]. Cette tendance se vérifie avec des résultats similaires pour 3 analyseurs différents (Coulter LH 750, Sysmex XE5000 et Advia 2120) à 4h et 24h suivant le prélèvement [99]. Le MPV est significativement différent au bout de 24h même avec l'utilisation du tube ThromboExact® mais l'augmentation est moins marquée qu'avec l'EDTA [99]. Le tube ThromboExact® présente donc l'avantage de pouvoir limiter l'impact du temps sur l'augmentation du MPV par rapport à l'EDTA.

2.3.3. Influence du tube ThromboExact® sur les autres variables hématologiques

Schuff-Werner et al. ont montré sur 21 patients sains que la numération érythrocytaire et leucocytaire ainsi que la différenciation leucocytaire sont comparables entre le tube EDTA et le tube ThromboExact®. De même, la qualité des frottis est comparable entre les deux tubes [23].

Les résultats de *François et al.* sur 23 patients ne présentant pas de pseudothrombopénie ont montré que le composant plaquettaire moyen (mean platelet component MPC) mesuré avec l'ADVIA 2120 est significativement moins élevé avec le tube ThromboExact® qu'avec le tube EDTA [94]. Le MPC est une variable plaquettaire donnée par certains automates utilisant la

cytométrie de flux. Le MPC est calculé à partir de l'indice de réfraction et est corrélé à la densité et donc la granularité des plaquettes, il diminue avec l'activation et la dégranulation plaquettaires [102]. La diminution du MPC dans le tube ThromboExact® par rapport au tube EDTA suggère donc une activation des plaquettes. De même, l'analyse du diagramme de la diffraction des plaquettes a montré l'apparition de particules de petites tailles sans granulations dans les tubes ThromboExact® chez les patients avec pseudothrombopénie et chez les témoins, cette observation a été confirmée par l'observation de plaquettes sans granulations au frottis. Pour 6 patients témoins, une seconde analyse a été réalisée 9 heures après la première et n'a pas montré de diminution du MPC, suggérant l'absence d'activation supplémentaire dans le tube ThromboExact® contrairement au tube EDTA où le gonflement des plaquettes et leur activation augmentent avec le temps [94].

Mannuß et al. ont montré sur 21 patients témoins que l'expression de CD62 (sélectine P) -une molécule présente dans les granules et donc marqueur de l'activation et de la dégranulation des plaquettes- est plus faible en présence de citrate ou de MgSO₄ suggérant une activation des plaquettes moins importante dans ces anticoagulants par rapport à l'EDTA [22]. Ce résultat contredit l'hypothèse de *François et al.* selon laquelle la diminution du MPC dans le tube ThromboExact® par rapport au tube EDTA résulte d'une activation des plaquettes. Cette diminution du MPC est probablement en lien avec la forme discoïde des plaquettes en présence de MgSO₄ ou de citrate, contrairement à l'EDTA qui provoque des changements de forme des plaquettes vers une forme sphérique et leur gonflement avec le temps [22, 102]. En effet, pour un objet discoïde la diffraction de la lumière dépend en plus du volume et de l'indice de réfraction, de l'orientation du disque par rapport au flux lumineux ce qui n'est pas le cas pour les objets sphériques. Ainsi l'orientation des plaquettes discoïdes peut être à l'origine d'une sous estimation du MPC [102].

**SECONDE PARTIE (ETUDE
EXPERIMENTALE) :**

**L'utilisation du tube ThromboExact® dans l'espèce
féline**

Cette partie présente les résultats d'une étude comparative entre un tube K3 EDTA et le tube ThromboExact® concernant la numération plaquettaire et la présence d'agrégats plaquettaires au frottis. Cette étude a été réalisée sur des spécimens analysés au laboratoire de l'École nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT).

1. Protocole

1.1. Personnes impliquées

Amélie Marchand et Françoise Michel : réalisation des prélèvements

Dr Catherine Trumel : Coordination de l'étude, analyse des prélèvements

Théo Chenal : Regroupement des résultats, analyse des prélèvements, interprétation des résultats

Jean-Pierre Braun : Analyse des données récoltées

1.2. Période et durée de l'étude

L'étude s'est déroulée entre juillet et octobre 2020.

1.3. Protocole expérimental

1.3.1. Recrutement des animaux

Les prélèvements ont été réalisés sur des chats présentés en consultation ou hospitalisés à l'ENVT après accord du propriétaire (signature d'un consentement éclairé). La nature de leur affection tout comme leur statut sanitaire ou leur stade physiologique n'ont pas été des critères de sélection.

1.3.2. Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés par Amélie Marchand ou Françoise Michel. La contention de l'animal a été réalisée par un étudiant ou un interne.

A l'aide d'une tondeuse adaptée au chat (silencieuse), un rectangle de 2 cm de long sur 1,5 cm a été tondu au niveau de la fosse jugulaire lorsque l'animal n'était pas trop stressé.

La compression a été effectuée par la personne qui prélève. Les prélèvements ont été effectués avec une aiguille stérile 23Gx5/8" (0.6x16mm) montée sur un corps de prélèvement BD Vacutainer® et récoltés directement dans le tube Sarstedt ThromboExact® (S-Monovette® 2,7 ml, 66x11 mm). Un vide était préalablement créé dans le tube en tirant le piston au maximum puis en le cassant. Pour les spécimens témoins, les prélèvements ont été récoltés avec le même système mais sur tube EDTA sous vide (Vacumed® 13x75 mm avec K3 EDTA x 3 ml de sang) à la place du tube ThromboExact®.

Chaque tube a ensuite été identifié avec le numéro de dossier de l'animal et acheminé directement vers le laboratoire de l'ENVT où il est analysé.

Lorsque l'animal ne nécessitait pas d'analyse hématologique pour sa prise en charge diagnostique, un prélèvement sur tube ThromboExact® a été prélevé puis un autre sur tube EDTA si le tempérament et la patience de l'animal le permettaient. Pour les animaux dont la prise en charge diagnostique nécessitait une analyse hématologique, l'ordre des tubes était inversé.

1.4. Étapes pré-analytiques et analytiques

Deux sous-études ont été réalisées : une étude comparative concernant les chats pour lesquels les deux types de tubes ont pu être réalisés (étude Comp) et une étude concernant tous les spécimens récoltés sur la période de l'étude (étude Per).

Chaque tube (EDTA ou ThromboExact®) a fait l'objet d'une analyse hématologique de routine :

- comptage cellulaire par cytométrie de flux par l'automate d'hématologie (Sysmex XT-2000iV-1) pour lesquels les résultats ont été regroupés dans le logiciel utilisé par les cliniques de l'ENVT (et des autres ENV) : Clovis.
- un frottis sanguin par tube récolté a été réalisé au moyen d'une lame porte objet en verre lavée (Thermo scientific, Menzel-Gläser, lame porte-objet prête à l'emploi, ca/env 76x26mm) sur laquelle a été déposée une petite goutte de sang à l'aide d'une pipette en verre (pipette pasteur en verre à usage unique, C.E.B., Angers, France) ou d'un tube capillaire en verre pour microhématocrite. Cette goutte a ensuite été étalée avec une lame rodée (Menzel-Gläser, lame à bords rodés, LRE, 50x20mm) positionnée à 30°, conformément aux normes C.L.S.I. (Clinical and Laboratory Standard Institute). Les frottis sanguins ont été séchés à l'air libre par agitation et ont été identifiés avec le numéro de dossier de l'animal ainsi que le numéro de laboratoire et le numéro d'hémogramme. Les frottis sanguins ont été colorés et montés dans

l'heure suivant leur réalisation au moyen d'une coloration May-Grünwald Giemsa par une coloreuse automatique (Aerospray hematology slide stainer cytocentrifuge 7150, Wescor, Logan, UT).

Une lecture des frottis sanguins a été réalisée. Un comptage différentiel sur 100 leucocytes a été établi pour chaque frottis. La répartition des cellules, la morphologie et l'aspect quantitatif ont été estimés. La présence et la quantité d'agrégats qu'ils soient plaquettaires, leucocytaires, ou leucoplaquettaires a également été estimée et notée – (absence), +/- (présence en très faible quantité), + (présence en faible quantité) , ++ (présence en quantité modérée), +++ (présence en quantité importante), ++++ (présence en quantité très importante).

Les lames ont toutes été analysées les unes à la suite des autres sans interruption afin de limiter au maximum le biais lié à l'estimation de la quantité d'agrégats.

1.5. Étapes post-analytiques

1.5.1. Résultats

Les résultats d'analyses ont été collectés et retranscrits dans le logiciel Clovis comme pour les analyses effectuées en routine à l'ENVT. Les frottis ont été relus une première fois par Théo Chenal puis par le Dr Catherine Trumel et les résultats ont été collectés dans deux feuilles de calcul Excel. Une feuille correspondant à l'étude Comp et regroupant les résultats pour lesquels un tube EDTA et un tube ThromboExact® ont pu être prélevés sur le même individu (n=16) et l'autre feuille correspondant à l'étude Per portant sur tous les prélèvements effectués sur la période (n=24 pour le tube ThromboExact® et n=43 pour le tube K3-EDTA). Les scores d'agrégats ont ensuite été convertis en scores de 0 à 4 (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4) pour faciliter les analyses statistiques.

1.5.2. Interprétation des résultats scientifiques – statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Excel et Reference Value Advisor macroinstructions (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA).

2. Résultats (Annexe 3)

Dans les deux études, la numération plaquettaire n'est significativement pas différente entre l'utilisation des tubes ThromboExact® et des tubes K3-EDTA. Pour l'étude Per, la numération plaquettaire moyenne avec le tube ThromboExact® (n=24) est de $274,6 \cdot 10^9/L$ et $245,6 \cdot 10^9/L$ avec le tube K3-EDTA (n=43), cette différence n'est pas significative (p-value 0,9843 avec le test Mann-Whitney - *Tableau 4*). Pour l'étude Comp (n=16) en revanche, la numération plaquettaire moyenne est légèrement plus faible avec le tube ThromboExact® ($264,3 \cdot 10^9/L$) qu'avec l'EDTA ($267,6 \cdot 10^9/L$), ici la p-value est nettement moins élevée (0,0833 avec le test de Wilcoxon - *Tableau 5*) mais la différence reste non significative.

La numération plaquettaire décroît avec l'augmentation du score d'agrégats plaquettaires pour les deux études (p-value 0,0126 avec n=15 pour l'étude Comp -*Tableau 6*- et p-value 0,0003 avec n=67 pour l'étude Per -*Tableau 7*). En revanche, la numération plaquettaire semble augmenter avec le score d'agrégats leucoplaquettaires pour le tube ThromboExact® (n=11) dans l'étude Per (n=67) mais la différence n'est pas significative (p-value respectivement de 0,2210 et 0,9971 avec la corrélation de Spearman - *Tableaux 8, 9*).

L'étude Per montre une quantité plus importante d'agrégats plaquettaires avec le tube ThromboExact® (score moyen 1,42) qu'avec le tube K3-EDTA (score moyen 0,73) ; cette différence est significative avec le test de Mann-Whitney (p-value 0,0183) (*Tableau 10*). Cette différence se retrouve dans l'étude Comp (score moyen d'agrégat plaquettaire de 1,31 pour le tube ThromboExact® et 0,97 pour le tube K3-EDTA) mais n'est en revanche pas significative (p-value 0,3394 avec le test de Wilcoxon - *Tableau 11*).

Concernant l'étude Per, la présence d'agrégats leucoplaquettaires est nettement plus importante avec le tube ThromboExact® (score moyen 1,48) qu'avec le tube K3-EDTA (score moyen 0,03) avec une p-value inférieure 0,0001 avec le test de Mann-Whitney (*Tableau 12*). Cette différence se retrouve dans l'étude Comp (scores moyen de 1,78 pour le tube ThromboExact® et 0,09 pour le tube K3-EDTA) avec une p-value inférieure à 0,001 avec le test T apparié (*Tableau 12*). Seulement 2 spécimens sur 43 récoltés sur tube K3-EDTA présentent des agrégats leucoplaquettaires avec un score de 0,5 pour l'un et 1 pour l'autre. Ces deux spécimens font également partie de l'étude Comp.

Aucune relation entre l'importance des agrégats plaquettaires et leucoplaquettaires n'a été mise en évidence. Des agrégats leucocytaires ont également été observés (2 avec le tube K3-

EDTA avec des scores de 1 et 2 et 2 avec le tube ThromboExact® avec des scores de 0,5 et 1) mais aucune interprétation n'est possible en raison de leur trop faible nombre.

Les résultats de l'étude Comp ont par ailleurs montré une baisse de la numération plaquettaire avec l'âge avec une p-value de 0,0072 avec la corrélation de Spearman (*Tableau 13*). Aucun effet sexe n'a été observé.

De rares plaquettes sont parfois présentes au sein des agrégats leucocytaires (*Figure 7*). Des exemples des différents types d'agrégats sont illustrés à la page suivante (*Figures 5-7*).

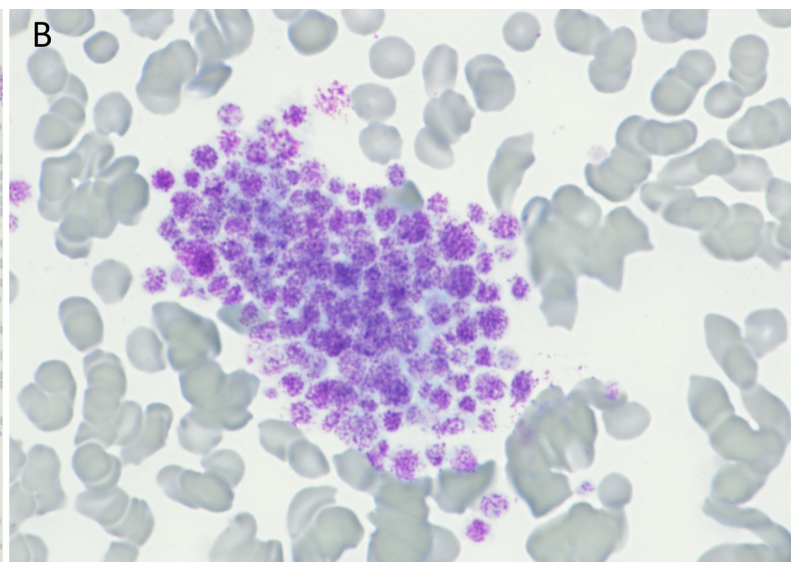
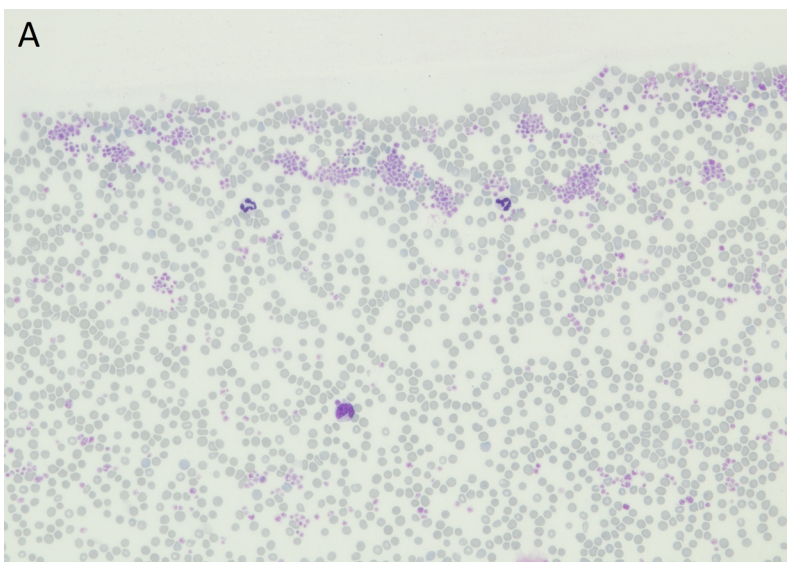


Figure 5 : Photographies d'agrégats plaquettaires, microscope optique grossissement x400 (A) et x1000 (B) (photographie personnelle)

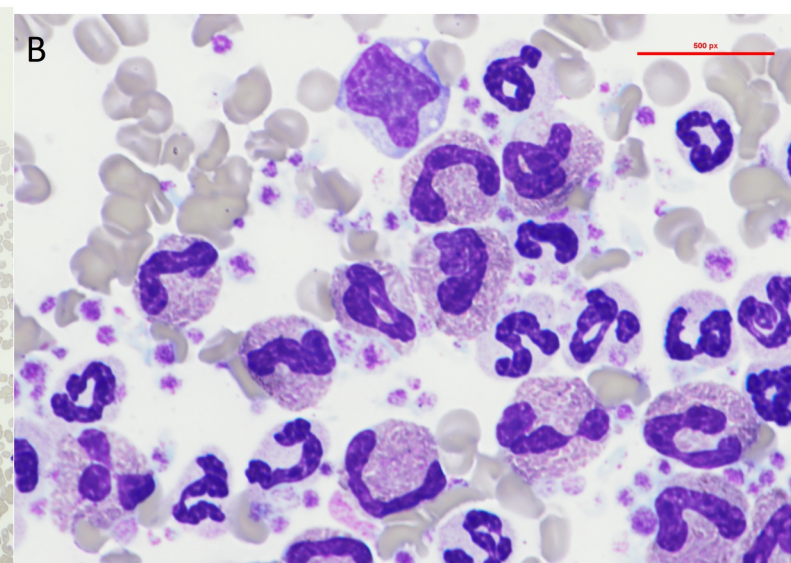
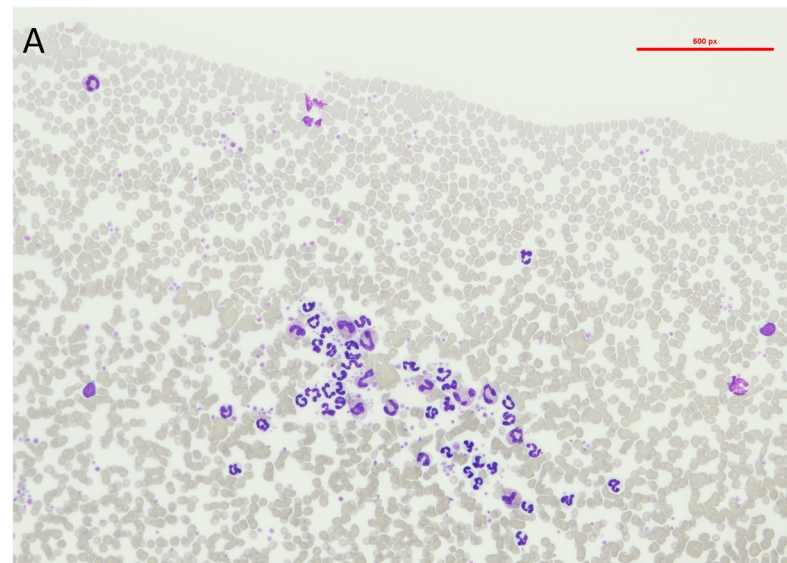


Figure 6 : Photographies d'ALP, microscope optique grossissement x400 (A) et x1000 (B) (photographie personnelle)

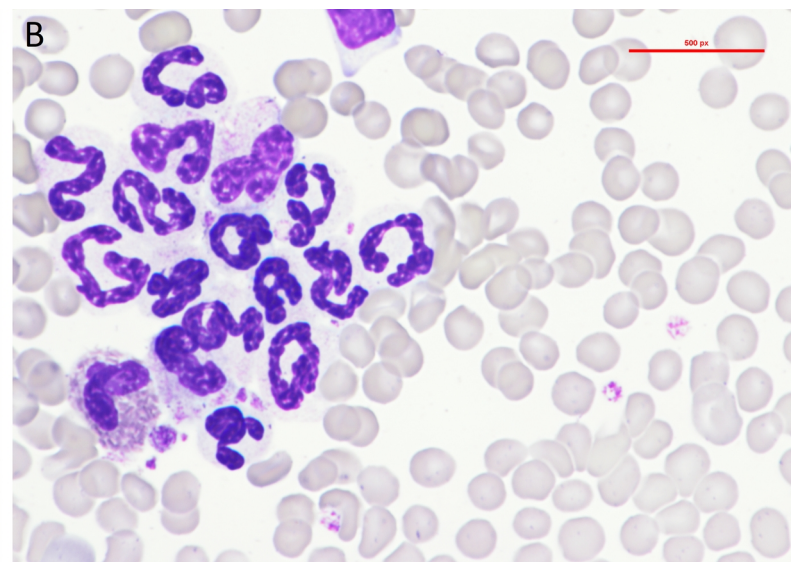
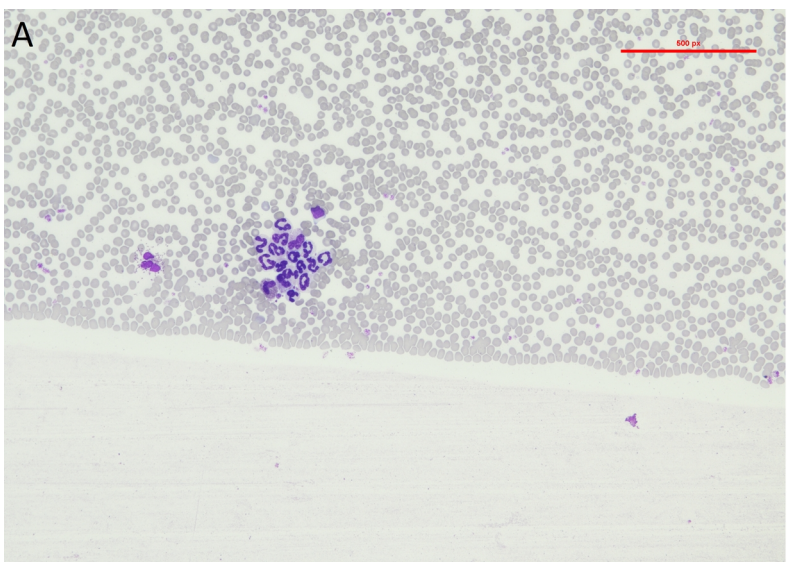


Figure 7 : Photographies d'agrégats leucocytaires, microscope optique grossissement x400 (A) et x1000 (B) (photographie personnelle)

DISCUSSION

L'étude a mis en évidence une tendance à l'augmentation de la quantité d'agrégats plaquettaires avec le tube ThromboExact® par rapport au tube K3-EDTA avec une différence significative pour l'étude Per mais pas pour l'étude Comp. Elle a également mis en évidence la présence en grande quantité d'agrégats leuco-plaquettaires (ALP). L'effet antiagrégant du MgSO₄ observé chez l'Homme n'est donc pas retrouvé dans l'espèce féline. Cette étude ne s'étant intéressée qu'à l'observation d'agrégats en présence de MgSO₄ il est difficile de proposer des hypothèses physiologiques pour expliquer cette différence avec l'espèce humaine. L'étude de différents marqueurs de l'activation et l'agrégation plaquettaire (développés dans la partie I.1.2 comme par exemple la concentration en AMPc, TxA₂, l'expression membranaire de P sélectine ...) en présence de MgSO₄ dans l'espèce féline pourrait permettre de comprendre l'origine de cette différence avec l'espèce humaine. Il pourrait également être intéressant d'étudier les effets de concentrations plus faibles ou plus importantes de MgSO₄ sur l'agrégation dans cette espèce.

Concernant les ALP, à notre connaissance, aucune observation de telles entités n'a été rapportée dans la littérature à ce jour dans l'espèce féline. De telles observations sont en revanche rapportées chez l'espèce humaine avec la présence de plaquettes satellites (ou « en rosettes ») ou d'ALP. L'observation d'ALP est relativement rare dans l'espèce humaine avec l'utilisation d'EDTA, 3 % des pseudothrombopénies seulement sont attribuées à la présence de plaquettes satellites [103]. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ces phénomènes. *Bizzaro et al.* ont mis en évidence la présence d'un anticorps de type IgG EDTA-dépendant dirigé contre l'intégrine α IIb β 3 des plaquettes et le récepteur Fc γ RIII (CD16) des neutrophiles, dans le sérum de 14 individus présentant des plaquettes en rosettes [104]. Un mécanisme similaire est potentiellement à l'origine des 2 spécimens de notre étude récoltés sur tube K3-EDTA présentant des ALP.

Par ailleurs, la dégranulation des plaquettes lors de leur activation entraîne une libération de thrombospondine (TSP) qui peut agir comme un pont entre les récepteurs GP IV des plaquettes et des monocytes (*Figure 8*) [105]. Elle entraîne également la libération de P sélectine qui se retrouve au niveau de la membrane plasmique des plaquettes. Celle-ci peut alors se lier à son récepteur, PSGL-1 exprimé de manière constitutive à la surface des leucocytes (*Figure 8*) [106].

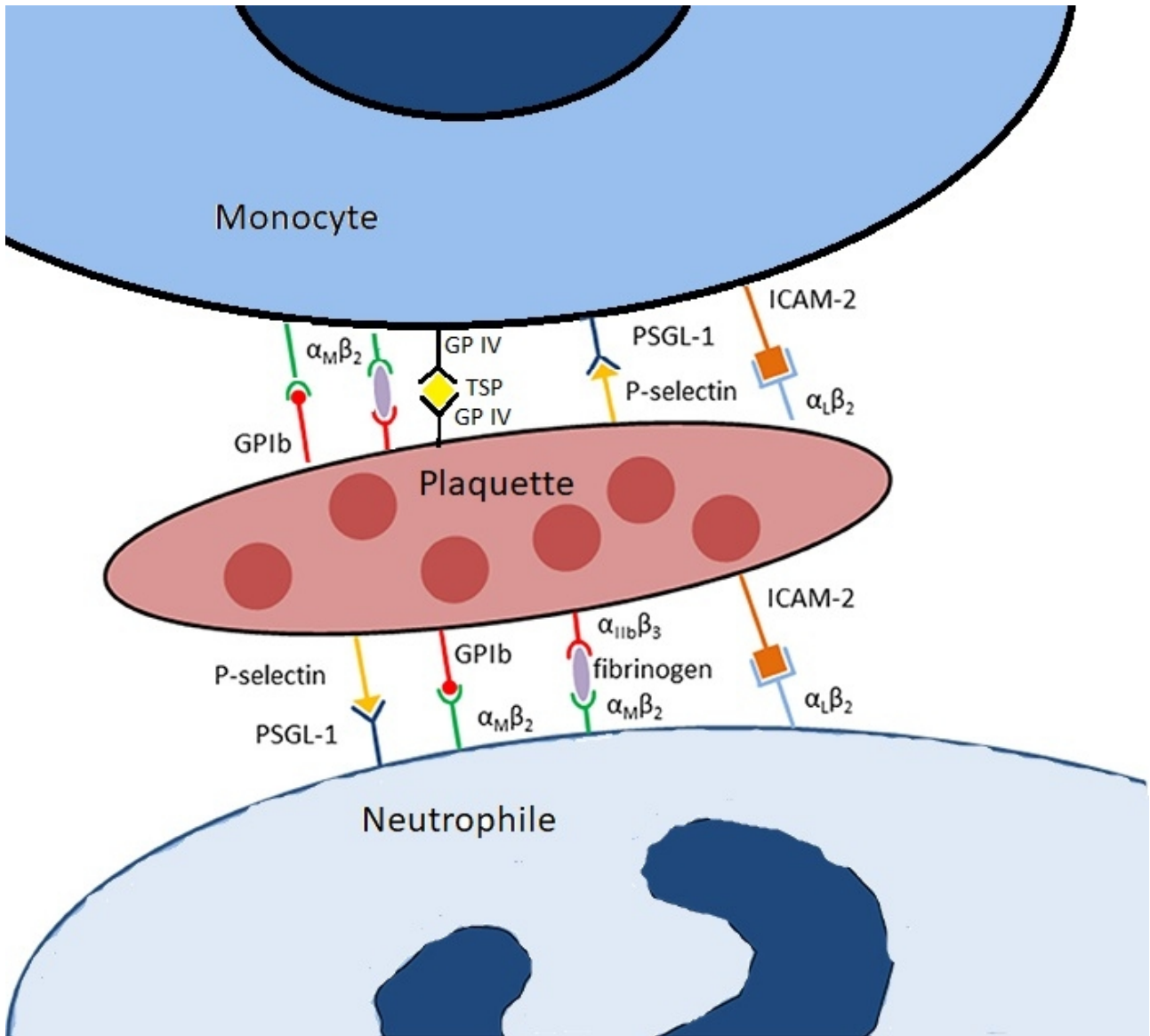


Figure 8 : Principales voies de liaison entre les plaquettes et les neutrophiles/monocytes d'après Rossaint et al. [120]

Les sélectines sont des protéines Ca^{2+} dépendantes et l'utilisation d'EDTA rend définitivement indisponible le Ca^{2+} et empêche la formation d'ALP [107]. L'ajout d'EDTA à un spécimen récolté sur hirudine entraîne même la dissociation des complexes leuco-plaquettaires [108].

La présence d'ALP dépend de l'anticoagulant utilisé, ils sont plus rares en présence de citrate (probablement du fait de la complexation partielle du Ca^{2+} par le citrate) qu'en présence d'héparine, hirudine ou PPACK (D-Phénylalaninyl-prolyl-argininyl Chlorométhyl Ketone) [109].

Contrairement à l'EDTA, le MgSO₄ n'empêche pas la liaison Ca²⁺-dépendante impliquant la P sélectine [110]. Ainsi, bien que non rapportée dans la littérature dans l'espèce humaine, l'observation d'ALP avec l'utilisation du tube ThromboExact® est tout à fait envisageable [107]. L'hypothèse d'ALP masqués par l'utilisation de routine de l'EDTA chez le chat est alors tentante pour expliquer la présence d'ALP en grande quantité avec le MgSO₄ dans notre étude. Pour autant, aucune observation d'ALP n'a été rapportée dans la littérature chez le chat malgré la présence d'études portant sur l'agrégation plaquettaire avec l'utilisation de divers anticoagulants -et l'observation du frottis sanguin.

Approximativement 4 à 14 % des monocytes et 2 à 12 % des neutrophiles de donneurs en bonne santé récoltés sur tube citraté sont liés à des plaquettes [106]. De plus, tous les phénomènes aboutissant à une activation des plaquettes sont susceptibles de provoquer la formation d'ALP *in vivo* ou *in vitro*. La présence d'agrégats monocytes-plaquettes est même plus sensible pour repérer l'activation plaquettaire que le dosage de P sélectine [111]. Chez l'Homme, des affections telles que les maladies cardiovasculaires, les affections pulmonaires aiguës, l'arthrite rhumatoïde, l'*inflammatory bowel disease*, les glomérulonéphrites, les AVC [112] ainsi que l'hypercholestérolémie et le diabète sucré [113], ... , sont associées à la présence en plus grande quantité d'ALP. Chez le chat les cardiomyopathies hypertrophiques (CMH) sont associées à une expression accrue de P sélectine au niveau de la membrane des plaquettes -d'autant plus importante que la CMH est sévère et qu'il y a un souffle, suggérant une activation de ces dernières [114]. Aucune observation d'ALP n'est rapportée dans cette étude mais aucune observation de frottis ne semble avoir été réalisée. La présence de TNF α - une cytokine pro-inflammatoire- en quantité augmentée provoque également une hyperréactivité des plaquettes chez la souris [115].

Notre étude comporte majoritairement des chats « malades » amenés pour divers motifs en consultation aux cliniques de l'ENVV. La présence en grande quantité d'ALP est potentiellement, au moins en partie biaisée par l'échantillonnage pouvant très largement comporter de nombreux individus avec des ALP circulants secondaires à un contexte particulier (CMH, ...) ou simplement un contexte inflammatoire.

Visuellement au frottis dans notre étude, les granulocytes et les monocytes sont les leucocytes majoritairement présents dans les ALP, la présence de lymphocytes est plus exceptionnelle. Ces observations concordent avec les données disponibles chez l'Homme qui montrent que le récepteur PSGL-1 est présent sur plusieurs types de leucocytes, les plaquettes se lient

préférentiellement aux monocytes, suivis des neutrophiles et des lymphocytes dans une moindre mesure [111, 116].

Les limites de notre étude sont l'effectif relativement faible et la présence de chats « sains » et « malades » présents dans le même effectif sans considération du statut pathologique. Il est donc important de rester prudent quant à l'interprétation des résultats.

CONCLUSION

Malgré le faible nombre d'individus testés, cette étude expérimentale a permis de démontrer que l'utilisation du tube ThromboExact en hématologie féline n'a pas d'intérêt par rapport à l'utilisation d'un tube K3-EDTA étant donné la présence en quantité similaire (voire augmentée) d'agrégats plaquettaires et la quantité importante d'ALP pouvant être à l'origine de nombreuses erreurs analytiques.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

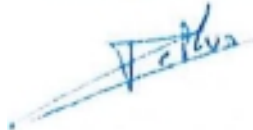
En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, Catherine TRUMEL, Enseignant-chercheur, de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de Théo CHENAL, intitulée « Intérêt de l'utilisation des tubes ThromboExact® pour limiter la présence d'agrégats plaquettaires lors d'analyse hématologique chez le chat » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 23/08/2021
Enseignant-chercheur de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeure Catherine TRUMEL.



Vu :
La Présidente du jury
Professeure Véronique DE MAS



Vu :
Le Directeur de l'École Nationale
Vétérinaire de Toulouse
M. Pierre SANS



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul
Sabatier
Monsieur Jean-Marc BROTO
Par délégation, le Doyen de la faculté de
Médecine de Toulouse-Rangueil
Monsieur Elie SERRANO



M. CHENAL Théo
a été admis sur concours en : 2016
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 06/07/2020
a validé son année d'approfondissement le: 01/09/2021
n'ont plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider



BIBLIOGRAPHIE

- [1] MACKIN A. (2006) Platelet disorders. In: Consultations in feline internal medicine. St Louis, Missouri, Elsevier Saunders. ; 5, 575-584.
- [2] BRAUN, Jean-Pierre, BOURGES-ABELLA, Nathalie, GEFFRE Anne, CONCORDERT, Didier, BOURDAUD'HUI Pascal, TRUMEL Catherine. (2015). Eviter ou contrôler les erreurs de prélèvements en hématologie, hémostase, cytologie, biochimie animales : une introduction à Preanalytical Variability Advisor. *Revue de médecine vétérinaire*. 166. 280-303.
- [3] COWELL Rick L., TYLER Ronald D., MEINKOTH James H. (2006) In : *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat (second edition)*, Elsevier Inc., New York, New York, USA. p.256
- [4] NORMAN EJ, BARRON RC, NASH AS, CLAMPITT RB. (2001) Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Vet Clin Pathol.* ; 30(3):137-140. doi: 10.1111/j.1939-165x.2001.tb00422.x. PMID: 12024313; PMCID: PMC7488585.
- [5] GOGGS R, POOLE AW. (2012) Platelet signaling-a primer. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2012 Feb;22(1):5-29. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00704.x. Epub 2012 Feb 3. PMID: 22316389.
- [6] WIINBERG B, JESSEN LR, TARNOW I, KRISTENSEN AT. (2012) Diagnosis and treatment of platelet hyperactivity in relation to thrombosis in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2012 Feb;22(1):42-58. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00708.x. PMID: 23016743.
- [7] BITCHER HI, LICHT A. (1969) Effect of adrenaline infusion on platelet aggregation in the cat as determined using the screen filtration pressure method. *Pharmacology*. ;2(4):209-16. doi: 10.1159/000136020. PMID: 5807062.
- [8] MACMILLAN DC, SIM AK. (1970) A comparative study of platelet aggregation in man and laboratory animals. *Thromb Diath Haemorrh.* ;24:385-394.
- [9] ZELMANOVIC D, HETHERINGTON EJ. (1998) Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Vet Clin Pathol.* ;27(1):2-9. doi: 10.1111/j.1939-165x.1998.tb01071.x. PMID: 12075552.
- [10] TVEDTEN HW, BACKLUND K, LILLIEHOOK IE. (2015) Reducing error in feline platelet enumeration by addition of Iloprost to blood specimens: comparison to prostaglandin E1 and EDTA. *Vet Clin Pathol.* 2015 Jun;44(2):179-87. doi: 10.1111/vcp.12247. Epub 2015 Apr 24. PMID: 25911961.
- [11] RIOND B, WABMUTH AK, HARTNACK S, HOFMANN-LEHMANN R, LUTZ H. (2015) Study on the kinetics and influence of feline platelet aggregation and deaggregation. *BMC Vet Res.* 2015 Nov 5;11:276. doi: 10.1186/s12917-015-0590-7. PMID: 26542105; PMCID: PMC4635602.
- [12] HART S, NOLTE I. Zur (1991) Thrombozytenaggregation bei der Katze [Thrombocyte aggregation in the cat]. *Tierarztl Prax.* 1991 Aug;19(4):413-8. German. PMID: 1948990.
- [13] MATSUKAWA T, HIKASA Y. (2020) Effects of imidazoline and nonimidazoline α -adrenoceptor agonists and antagonists, including xylazine, medetomidine, dexmedetomidine, yohimbine, and atipamezole, on aggregation of feline platelets. *Am J Vet Res.* 2020 Feb;81(2):159-171. doi: 10.2460/ajvr.81.2.159. PMID: 31985287.
- [14] MORITZ A, HOFFMANN C. (1997) Thrombozytenzählung bei der Katze [Platelet count in the cat]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* 1997 Nov;25(6):695-700. German. PMID: 9459839.

- [15] WEISER MG, KOCIBA GJ. (1984) Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats. *Am J Vet Res.* 1984 Mar;45(3):518-22. PMID: 6711980.
- [16] KNOLL JS, ROWELL SL. (1996) Clinical hematology. In-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1996 Sep;26(5):981-1002. doi: 10.1016/s0195-5616(96)50051-3. PMID: 8863386.
- [17] NORMAN EJ, BARRON RC, NASH AS, CLAMPITT RB. (2001) Evaluation of a citrate-based anticoagulant with platelet inhibitory activity for feline blood cell Counts. *Vet Clin Pathol.* 2001 ;30(3):124-132. doi: 10.1111/j.1939-165x.2001.tb00420.x. PMID: 12024311.
- [18] GRANAT Fanny, GEFRE Anne, BRAUN Jean-Pierre, TRUMEL Catherine. (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.* 2011 Dec;13(12):953-8. doi: 10.1016/j.jfms.2011.07.014. Epub 2011 Nov 12. PMID: 22079363.
- [19] BERTINATO J., WU XIAO C., RATNAYAKE W. M., et al. (2015) Lower serum magnesium concentration is associated with diabetes, insulin resistance, and obesity in South Asian and white Canadian women but not men. *Food & Nutrition Research.* ;59(1, article 25974) doi: 10.3402/fnr.v59.25974.
- [20] GROBER U., SCHMIDT J., KISTERS K. (2015) Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients.* ;7(9):8199–8226. doi: 10.3390/nu7095388.
- [21] SHIONOYA T. (1927) Studies in experimental extracorporeal thrombosis : Influence of certain chemical substances on extracorporeal thrombosis with special reference to the efficacy of a combination of heparin and magnesium sulfate. *J Exp Med.* 1927 Nov 30;46(6):963-77. doi: 10.1084/jem.46.6.963. PMID: 19869386; PMCID: PMC2131331.
- [22] MANNUB S, SCHUFF-WERNER P, DREIBIGER K, KOHLSCHEIN P. (2016) Magnesium Sulfate as an Alternative In Vitro Anticoagulant for the Measurement of Platelet Parameters? *Am J Clin Pathol.* 2016 Jun;145(6):806-14. doi: 10.1093/ajcp/aqw066. Epub 2016 Jun 8. PMID: 27282617.
- [23] SCHUFF-WERNER P, STEINER M, FENGER S, GROSS HJ, BIERLICH A, DREISSIGER K, MANNUB S, SIEGERT G, BACHEM M, KOHLSCHEIN P. (2013) Effective estimation of correct platelet counts in pseudothrombocytopenia using an alternative anticoagulant based on magnesium salt. *Br J Haematol.* 2013 Sep;162(5):684-92. doi: 10.1111/bjh.12443. Epub 2013 Jun 29. PMID: 23808903; PMCID: PMC3796857.
- [24] BONEU B, CAZENAVE JP , (1997). Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose. 2e édition éd. Alinéa, 281 p., Reims
- [25] GRUNER S, PROSTREDNA M, SCHULTE V, et al. (2003) Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. *Blood* ; 2003 Dec 1, 102(12):4021–4027.
- [26] MOROI M, JUNG SM, NOMURA S, et al. (1997) Analysis of the involvement of the von Willebrand factor–glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface underflowconditions. *Blood* ; 90(11):4413–4424.
- [27] SAVAGE B, SALDIVAR E, RUGGERI ZM. (1996) Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* ; 84(2):289–297.
- [28] MUNDAY AD, BERNDT MC, MITCHELL CA. (2000) Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta. *Blood* ; 96(2):577–584.
- [29] JACKSON SP, YAP CL, ANDERSON KE. (2004) Phosphoinositide 3-kinases and the regulation of platelet function. *Biochem Soc Trans* ; 32(Pt 2):387–392.

- [30] MORTON LF, HARGREAVES PG, FARNDALE RW et al. (1995) Integrin alpha 2 beta 1-independent activation of platelets by simple collagenlike peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for alpha 2 beta 1-independent platelet reactivity. *Biochem J*; 306(Pt 2):337-344.
- [31] MARKS F, KLINGMUELLER U, MUELLER-DECKER K. (2009) Signal transduction by receptors with seven transmembrane domains, In: *Cellular Signal Processing*, 1st ed. New York: Garland Science, pp. 183-218.
- [32] CHEN J, ISHII M, WANG L, et al. (1994) Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. *J Biol Chem* ; 269(23):16041-16045.
- [33] BOUDREAUX MK. (2010) Platelet Structure, In: WEISS DJ, WARDROP KJ. Eds. *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th ed. Ames: Academic Press; pp. 561-568.
- [34] COVIC L, GRESSER AL, KULIOPULOS A. (2000) Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry* ; 39(18):5458-5467.
- [35] OHLMANN P, LAUGWITZ KL, NURNBERG B, et al. (1995) The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem J* ; 312(Pt 3):775-779.
- [36] MILLS DC. (1996) ADP receptors on platelets. *Thromb Haemostasis*; 1996 Dec;76(6):835-56. PMID: 8971999.
- [37] HARDY AR, JONES ML, MUNDELL SJ, et al. (2004) Reciprocal cross-talk between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood* ; 104(6):1745-1752.
- [38] HECHLER B, ECKLY A, OHLMANN P, et al. (1998) The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *J Haematol* ; 103(3):858-866.
- [39] PAUL BZ, DANIEL JL, KUNAPULI SP. (1999) Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change. *J Biol Chem* ; 274(40):28293-28300.
- [40] MUNDELL SJ, BARTON JF, MAYO-MARTIN MB, et al. (2008) Rapid resensitization of purinergic receptor function in human platelets. *J Thromb Haemostasis* ; 6(8):1393-1404.
- [41] KLAGES B, BRANDT U, SIMON MI, et al. (1999) Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol* ; 144(4):745-754.
- [42] JOHNSONN GJ, LEIS LA, KING RA. (1991) Thromboxane responsiveness of dog platelets is inherited as an autosomal recessive trait. *Thromb Haemost*. 1991 May 6;65(5):578-80. Erratum in: *Thromb Haemost* 1991 Aug 1;66(2):269. PMID: 1871719.
- [43] OGAWA T, SUGIDACHI A, ASAI F, KOIKE H. (1998) Involvement of platelet-derived 5-hydroxytryptamine in thromboxane A2-induced aggregation in cat platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998 Apr;9(3):233-40. doi: 10.1097/00001721-199804000-00003. PMID: 9663705.
- [44] WISE H, WONG YH, JONES RL. (2002) Prostanoid signal integration and cross talk. *Neurosignals* ; 11(1):20-28.
- [45] GILIO K, VAN KRUCHTEN R, BRAUN A, et al. (2010) Roles of platelet STIM1 and Orail in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation. *J Biol Chem* ; 285(31):23629-23638.
- [46] STEFANINI L, BERGMEIER W. (2010) CalDAG-GEFI and platelet activation. *Platelets*; 21(4):239-243.

- [47] CHRZANOWSKA-WODNICKA M, SMYTH SS, SCHOENWAEELDER SM, et al. (2005) Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *J Clin Invest* ; 115(3):680–687.
- [48] HAN J, LIM CJ, WATANABE N, et al. (2006) Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin α IIb β 3. *Curr Biol* ; 16(18):1796–1806.
- [49] MOSER M, NIESWANDT B, USSAR S, et al. (2008) Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* ; 14(3):325–330.
- [50] HSU LW, CHEN PW, CHANG WT, LEE WH, LIU PY. (2020) The Role of ROCK in Platelet-Monocyte Collaborative Induction of Thromboinflammation during Acute Coronary Syndrome. *Thromb Haemost.* 2020 Oct;120(10):1417-1431. doi: 10.1055/s-0040-1714278. Epub 2020 Sep 2. PMID: 32877952.
- [51] LECUT C, SCHOOLMEESTER A, KUIJPERS MJ, et al. (2004) Principal role of glycoprotein VI in α 2 β 1 and α IIb β 3 activation during collagen-induced thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ; 24(9):1727–1733.270.
- [52] FALATI S., PATIL S., GROSS P.L., STAPLETON M. et al. (2006), Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood*, 107, 535-541.
- [53] SCHWARZ U.R., WALTER U., EIGENTHALER M. (2001), Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochemical pharmacology*, 62, 1153-1161.
- [54] WALSH M-T, FOLEY JF, KINSELLA BT. (2000) The α , but not the β , isoform of the human thromboxane A2 receptor is a target for prostacyclinmediated desensitization. *J Biol Chem* ;275:20412–23.
- [55] PAOLISSO G , TIRELLI A , COPPOLA L , et al (1989) Magnesium administration reduces platelet hyperaggregability in *NIDDM*. *Diabetes Care* ;12:167–8.doi:10.2337/diacare.12.2.167b
- [56] NADLER J, MALAYAN S, LUONG H, et al: (1992) Evidence that intracellular free magnesium deficiency plays a key role in increased platelet reactivity in type II diabetes mellitus. *Diabetes Care* ;15:835-841.
- [57] SHEU JR, HSIAO G, SHEN MY, FONG TH, CHEN YW, LIN CH, CHOU DS. (2002) Mechanisms involved in the antiplatelet activity of magnesium in human platelets. *Br J Haematol.* 2002 Dec;119(4):1033-41. doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03967.x. PMID: 12472585.
- [58] HSIAO G, SHEN MY, CHOU DS, LIN CH, CHEN TF, SHEU JR. (2004) Involvement of the antiplatelet activity of magnesium sulfate in suppression of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biomed Sci.* 2004 Jan-Feb;11(1):19-26. doi: 10.1007/BF02256545. PMID: 14730206.
- [59] RAVN HB, VISSINGER H, KRISTENSEN SD, HUSTED SE. (1996), Magnesium inhibits platelet activity--an in vitro study. *Thromb Haemost.* 1996 Jul;76(1):88-93. PMID: 8819258.
- [60] HWANG David L., YEN Cindy F., NADLER Jerry L., (1992) Effect of Extracellular Magnesium on Platelet Activation and Intracellular Calcium Mobilization, *American Journal of Hypertension*, Volume 5, Issue 10, October 1992, Pages 700–706
- [61] GAWAZ M, OTT I, REININGER AJ, NEUMANN FJ. (1994) Effects of magnesium on platelet aggregation and adhesion. Magnesium modulates surface expression of glycoproteins on platelets in vitro and ex vivo. *Thromb Haemost.* 1994 Dec;72(6):912-8. PMID: 7740463.
- [62] RAVN HB, KRISTENSEN SD, VISSINGER H, HUSTED SE. (1996) Magnesium inhibits human platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996 Mar;7(2):241-4. doi: 10.1097/00001721-199603000-00033. PMID: 8735829.
- [63] SHECHTER M. (2000), The role of magnesium as antithrombotic therapy. *Wien Med Wochenschr.*;150(15-16):343-7. PMID: 11105330.

- [64] RAVN HB, KRISTENSEN SD, HJORTDAL VE, THYGESEN K, HUSTED SE. (1997) Early administration of intravenous magnesium inhibits arterial thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Dec;17(12):3620-5. doi: 10.1161/01.atv.17.12.3620. PMID: 9437213.
- [65] RAVN HB, VISSINGER H, KRISTENSEN SD, WENNMALM A, THYGESEN K, HUSTED SE. (1996) Magnesium inhibits platelet activity--an infusion study in healthy volunteers. *Thromb Haemost.* 1996 Jun;75(6):939-44. PMID: 8822590.
- [66] ADAMS JH, MITCHELL JR. (1979) The effect of agents which modify platelet behaviour and of magnesium ions on thrombus formation in vivo. *Thromb Haemost.* 1979 Aug 31;42(2):603-10. PMID: 505367.
- [67] COSEMANS JM, ISERBYT BF, DECKMYN H, HEEMSKERK JW. (2008) Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *J Thromb Haemost.* 2008 Aug;6(8):1253-61. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03041.x. Epub 2008 May 28. PMID: 18513212.
- [68] NAKAMURA T, JAMIESON GA, OKUMA M, KAMBAYASHI J, TANDON NN. (1998) Platelet adhesion to native type I collagen fibrils. Role of GPVI in divalent cation-dependent and -independent adhesion and thromboxane A2 generation. *J Biol Chem.* 1998 Feb 20;273(8):4338-44. doi: 10.1074/jbc.273.8.4338. PMID: 9468482.
- [69] SANTORO SA. (1986) Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell.* 1986 Sep 12;46(6):913-20. doi: 10.1016/0092-8674(86)90073-5. PMID: 3757029.
- [70] NIESWANDT B, BRAKEBUSCH C, BERGMEIER W, SCHULTE V, BOUVARD D, MOKHTARI-NEJAD R, LINDHOUT T, HEEMSKERK JW, ZIRNGIBL H, FÄSSLER R. (2001) Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J.* 2001 May 1;20(9):2120-30. doi: 10.1093/emboj/20.9.2120. PMID: 11331578; PMCID: PMC125246.
- [71] ZIJENAH LS, MORTON LF, BARNES MJ. (1990) Platelet adhesion to collagen. Factors affecting Mg²⁺-dependent and bivalent-cation-independent adhesion. *Biochem J.* 1990 Jun 1;268(2):481-6. doi: 10.1042/bj2680481. PMID: 2114094; PMCID: PMC1131458.
- [72] ZHU J, LUO BH, XIAO T, ZHANG C, NISHIDA N, SPRINGLER TA. (2008) Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell.* 2008 Dec 26;32(6):849-61. doi: 10.1016/j.molcel.2008.11.018. PMID: 19111664; PMCID: PMC2758073.
- [73] RABORN J, WANG W, LUO BH. (2011) Regulation of integrin α Ib β 3 ligand binding and signaling by the metal ion binding sites in the β I domain. *Biochemistry.* 2011 Mar 29;50(12):2084-91. doi: 10.1021/bi2000092. Epub 2011 Feb 22. PMID: 21309594.
- [74] GULINO D, BOUDIGNON C, ZHANG LY, CONCORD E, RABIET MJ, MARGUERIE G. (1992) Ca²⁺-binding properties of the platelet glycoprotein IIb ligand-interacting domain. *J Biol Chem.* 1992 Jan 15;267(2):1001-7. PMID: 1730629.
- [75] MAGÓCSI M, SARKADI B, KOVÁCS T, GÁRDOS G. (1989) Thrombin-induced activation of calcium transport pathways and their role in platelet functions. *Biochim Biophys Acta.* 1989 Aug 21;984(1):88-96. doi: 10.1016/0005-2736(89)90346-5. PMID: 2548622.
- [76] WATSON KV, MOLDOW CF, OGBURN PL, JACOB HS. (1986) Magnesium sulfate: rationale for its use in preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Feb;83(4):1075-8. doi: 10.1073/pnas.83.4.1075. PMID: 3513161; PMCID: PMC323013.
- [77] SATAKE K, LEE JD, SHIMIZU H, UZUI H, MITSUKE Y, YUE H, UEDA T. (2004) Effects of magnesium on prostacyclin synthesis and intracellular free calcium concentration in vascular cells. *Magnes Res.* 2004 Mar;17(1):20-7. PMID: 15083565.
- [78] O'BRIEN WF, WILLIAMS MC, BENOIT R, SAWAI SK, KNUPPEL RA. (1990) The effect of magnesium sulfate infusion on systemic and renal prostacyclin production. *Prostaglandins.* 1990 Nov;40(5):529-38. doi: 10.1016/0090-6980(90)90114-b. PMID: 2255768.

- [79] NAKAMOTO K, SUGIBAYASHI S, TAKAHASHI A, TERAUCHI S, HADA A, MUNAKATA M, TERAOKA A, KOMIYAMA Y, EGAWA H, MURATA K. (1986) [Platelet count in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia--application of MgSO₄ as an anticoagulant]. *Rinsho Byori*. 1986 Feb;34(2):167-73. Japanese. PMID: 3084831.
- [80] KONDO H, KOBAYASHI E, ITANI T, TATSUMI N, TSUDA I. (2002) Hematology tests of blood anticoagulated with magnesium sulphate. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2002;33 Suppl 2:6-9. PMID: 12755260.
- [81] LARDINOIS B, FAVRESSE J, CHATELAIN B, LIPPI G, MULLIER F. (2021) Pseudothrombocytopenia-A Review on Causes, Occurrence and Clinical Implications. *J Clin Med*. 2021 Feb 4;10(4):594. doi: 10.3390/jcm10040594. PMID: 33557431; PMCID: PMC7915523.
- [82] BACCINI V, GENEVIÈVE F, JACQMIN H, CHATELAIN B, GIRARD S, WUILLEME S, VEDRENNE A, GUIHENEUF E, TOUSSAINT-HACQUARD M, EVERAERE F, SOULARD M, LESESVE JF, BARDET V. (2020) Platelet Counting: Ugly Traps and Good Advice. Proposals from the French-Speaking Cellular Hematology Group (GFHC). *J Clin Med*. 2020 Mar 16;9(3):808. doi: 10.3390/jcm9030808. PMID: 32188124; PMCID: PMC7141345.
- [83] GOLANŃSKI J, PIETRUCHA T, BAJ Z, GREGER J, WATALA C. (1997) A novel approach to inhibit the anticoagulant-induced spontaneous activation of blood platelets--effect of magnesium on platelet release reaction in whole blood. *Thromb Res*. 1997 Jan 15;85(2):127-32. doi: 10.1016/s0049-3848(96)00229-0. PMID: 9058486.
- [84] DABADIE M, VALLI N, JACOBIN MJ, LAROCHE-TRAINEAU J, BARAT JL, DUCASSOU D, NURDEN AT, CLOFENT-SANCHEZ G, (2001) Characterisation, cloning and sequencing of a conformation-dependent monoclonal antibody to the alphaIIb beta3 integrin: interest for use in thrombus detection. *Platelets*. 2001 Nov; 12(7):395-405
- [85] LIPPI G, PLEBANI M.. (2012) EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: further insights and recommendations for prevention of a clinically threatening artifact. *Clin Chem Lab Med*. 2012 Aug;50(8):1281-5. doi: 10.1515/cclm-2012-0081. PMID: 22868791.
- [86] 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*. 2007 Feb;29(1):4-20. doi: 10.1111/j.1365-2257.2006.00870.x. PMID: 17224004.
- [87] MANTHORPE R, KOFOD B, WIJK A, SAXTURP O, SVEHAG SE. (1981) Pseudothrombocytopenia. In vitro studies on the underlying mechanism. *Scand J Haematol*. 1981 May;26(5):385-92. PMID: 7336152.
- [88] BIZZARO N. (1995) EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol*. 1995 Oct;50(2):103-9. doi: 10.1002/ajh.2830500206. PMID: 7572988.
- [89] KUHLMAN P, NASIM J, GOODMAN M. (2020) Pan-Pseudothrombocytopenia in COVID-19: A Harbinger for Lethal Arterial Thrombosis? *Fed Pract*. 2020 Aug;37(8):354-358. doi: 10.12788/fp.0032. PMID: 32908342; PMCID: PMC7473730.
- [90] ZHOU X, WU X, DENG W, LI J, LUO W. (2011) Amikacin can be added to blood to reduce the fall in platelet count. *Am J Clin Pathol*. 2011 Oct;136(4):646-52. doi: 10.1309/AJCPMON79QKQKRBT. PMID: 21917689.
- [91] ROBIER C, NEUBAUER M, STERNAD H, RAINER F. (2010) Hirudin-induced pseudothrombocytopenia in a patient with EDTA-dependent platelet aggregation: report of a new laboratory artefact. *Int J Lab Hematol*. 2010 Aug 1;32(4):452-3. doi: 10.1111/j.1751-553X.2009.01200.x. Epub 2009 Oct 28. PMID: 19878358.
- [92] KOVACS F, VARGA M, PATAKI Z, RIGO E. (2016) Pseudothrombocytopenia with multiple anticoagulant sample collection tubes. *Interv Med Appl Sci*. 2016 Dec;8(4):181-183. doi: 10.1556/1646.8.2016.4.4. PMID: 28180009; PMCID: PMC5283778.
- [93] ZHONG L, CHADHA J, AMERI A. (2020) A Curious Case of Pseudothrombocytopenia due to In Vitro Agglutination. *Case Rep Hematol*. 2020 Feb 13;2020:6236350. doi: 10.1155/2020/6236350. PMID: 32099698; PMCID: PMC7040393.

- [94] FRANÇOIS D, MASURE A, ATALLAH N, TOUIL L, VASSE M. (2014) Underestimation of platelet count on magnesium salt-anticoagulated samples. *Clin Chem Lab Med*. 2014 May;52(5):e95-7. doi: 10.1515/ccm-2013-1016. PMID: 24356392.
- [95] CHOCCALINGAM C, RADHA RKN, SNIGDHA N. (2017) Estimation of Platelet Counts and Other Hematological Parameters in Pseudothrombocytopenia Using Alternative Anticoagulant: Magnesium Sulfate. *Clin Med Insights Blood Disord*. 2017 Apr 24;10:1179545X17705380. doi: 10.1177/1179545X17705380. PMID: 28579856; PMCID: PMC5428203.
- [96] KOHLSCHEIN Peter, BÄNSCH Dietmar, DREISSIGER Katrin, SCHUFF-WERNER Peter. (2015). Exclusion of Thrombocytopenia as a Contraindication for Invasive Radiofrequency Ablation in a Patient with Paroxysmal Atrial Fibrillation by Using Magnesium Anticoagulation Instead of EDTA: Another Case of Anticoagulant-Induced Pseudo-Thrombocytopenia. *Heart Surgery Forum*. 18. E 090-92. 10.1532/hf.1323..
- [97] KOVACS F, VARGA M, PATAKI Z, RIGO E. (2016) Pseudothrombocytopenia with multiple anticoagulant sample collection tubes. *Interv Med Appl Sci*. 2016 Dec;8(4):181-183. doi: 10.1556/1646.8.2016.4.4. PMID: 28180009; PMCID: PMC5283778.
- [98] SCHUFF-WERNER Peter, MANSOUR Joe, GROPP Angela. "Pseudo-thrombocytopenia (PTCP). A challenge in the daily laboratory routine?" *Journal of Laboratory Medicine*, vol. 44, no. 5, 2020, pp. 295-304
- [99] MANNUB S, KOHLSCHEIN P, DREISSIGER K, SCHUFF-WERNER P. (2016) Measurement of Platelet Counts and Volume Using Magnesium Sulfate as an Anticoagulant: Comparison of Impedance and Light-Scatter Technology. *Am J Clin Pathol*. 2016 Nov 1;146(5):538-545. doi: 10.1093/ajcp/aqw146. PMID: 28430955.
- [100] MACEY M, AZAM U, MCCARTHY D, WEBB L, CHAPMAN ES, OKRONGLY D, 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*. 2002 Jun;48(6 Pt 1):891-9. PMID: 12029005.
- [101] MCSHINE RL, SIBINGA S, BROZOVIC B. (1990) Differences between the effects of EDTA and citrate anticoagulants on platelet count and mean platelet volume. *Clin Lab Haematol*. 1990;12(3):277-85. doi: 10.1111/j.1365-2257.1990.tb00038.x. PMID: 2125542.
- [102] SEGURA D, MONREAL L, ARMENGOU L, TARANCÓN I, BRUGUÉS R, ESCOLAR G. (2007) Mean platelet component as an indicator of platelet activation in foals and adult horses. *J Vet Intern Med*. 2007 Sep-Oct;21(5):1076-82. doi: 10.1892/0891-6640(2007)21[1076:mpcaai]2.0.co;2. PMID: 17939567.
- [103] BAHRII Raihane, AZNAG Mohamed Amine, KHAYATI Siham, ELFARSSANI Fadoua, EDDYB Saida, YAHYAOUI Hicham, AIT AMEURI Mustapha, CHAKOUR Mohamed, (2021) Pseudothrombocytopenia: Automate-Blood Smear Confrontation. *International Journal of Recent Innovations in Medicine and Clinical Research*, 2021 March, 2582-1075 <https://ijrimcr.com/> Volume-3, Issue-1, 2021: 21-29 21
- [104] BIZZARO Nicola, GOLDSCHMEDING Roel, VON DEM BORNE Albert E. G. Kr., (1995) Platelet Satellitism Is Fc γ RIII (CD 16) Receptor-Mediated, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 103, Issue 6, 1 June 1995, Pages 740–744,
- [105] CHRISTOPOULOS C, MATTOCK C. (1991) Platelet satellitism and alpha granule proteins. *J Clin Pathol*. 1991 Sep;44(9):788-9. doi: 10.1136/jcp.44.9.788. PMID: 1918416; PMCID: PMC496737.
- [106] GERRITS A.J., FRELINGER A.L., and MICHELSON A.D. (2016). Whole blood analysis of leukocyte-platelet aggregates : whole blood flow cytometry *Curr. Protoc. Cytom*. 2016, Oct 78:6.15.1-6.15.10. doi: 10.1002/cpcy.8
- [107] MANNUSS S. (2020) Influence of different methods and anticoagulants on platelet parameter measurement. *Journal of Laboratory Medicine*, 44(5), 255-272.

- [108] ZHAO L, BATH PM, MAY J, LÖSCHE W, HEPTINSTALL S. (2003) P-selectin, tissue factor and CD40 ligand expression on platelet-leucocyte conjugates in the presence of a GPIIb/IIIa antagonist. *Platelets* ;14:473–80
- [109] BOURNAZOS S, RENNIE J, HART SP, DRANSFIELD I. (2008) Choice of anticoagulant critically affects measurement of circulating platelet-leukocyte complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ;28:E2–3
- [110] GENG JG, BEVILACQUA MP, MOORE KL, MCINTYRE TM, PRESCOTT SM, KIM JM, BLISS GA, ZIMMERMAN GA, MCEVER RP. (1990) Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*. 1990 Feb 22;343(6260):757-60. doi: 10.1038/343757a0. PMID: 1689464.
- [111] MICHELSON AD, BARNARD MR, KRUEGER LA, VALERI CR, FURMAN MI. (2001) Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Sep 25;104(13):1533-7. doi: 10.1161/hc3801.095588. PMID: 11571248.
- [112] FINSTERBUSCH M, SCHROTTMAIER WC, KRAL-POINTNER JB, SALZMANN M, ASSINGER A. (2018) Measuring and interpreting platelet-leukocyte aggregates. *Platelets*. 2018 Nov;29(7):677-685. doi: 10.1080/09537104.2018.1430358. Epub 2018 Feb 20. PMID: 29461910; PMCID: PMC6178087.
- [113] PATKÓ Z, CSÁSZÁR A, ACSÁDY G, ORY I, TAKÁCS E, FÜRÉSZ J. (2012) Elevation of monocyte-platelet aggregates is an early marker of type 2 diabetes. *Interv Med Appl Sci*. 2012 Dec;4(4):181-5. doi: 10.1556/IMAS.4.2012.4.2. Epub 2012 Dec 27. PMID: 24265874; PMCID: PMC3831785.
- [114] TABLIN F, SCHUMACHER T, POMBO M., MARION C.T., HUANG K., NORRIS J.W., JANDREY K.E., KITTLESON M.D. (2014) Platelet Activation in Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10.1111/jvim.12325
- [115] GU SX, DAYAL S. (2020) Inflammation mediated platelet hyperactivity in aging. *Ann Blood*.;5:10. doi:10.21037/aob.2020.03.01
- [116] RINDER HM, BONAN JL, RINDER CS, AULT KA, SMITH BR. (1991) Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood*. 1991 Oct 1;78(7):1730-7. PMID: 1717069.
- [117] BALDUINI CL, NORIS P. (2014) Platelet count and aging. *Haematologica*. 2014 Jun ; 99(6):953-5. doi: 10.3324/haematol.2014.106260. PMID: 24881040; PMCID: PMC4040891.
- [118] HALKAR, MEGHANA, LINCOFF A. (2016). Dual antiplatelet therapy for acute coronary syndromes: How long to continue?. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 83. 675-688. 10.3949/ccjm.83a.15092.
- [119] CHARRU Pauline. (2011) 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.
- [120] ROSSAINT J, MARGRAF A, ZARBOCK A (2018) Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. *Front. Immunol*. 9:2712. doi: 10.3389/fimmu.2018.02712

ANNEXES

Annexe 1 : Protocole expérimental

Les phénomènes d'adhésion et d'agrégation in vivo sont essentiels pour la formation du clou plaquettaire lors de l'hémostase primaire mais, le phénomène d'agrégation plaquettaire in vitro représente l'une des difficultés pré-analytiques les plus fréquemment rencontrées en hématologie. Ceci limite l'obtention de spécimens sanguins adéquats pour les analyses hématologiques et l'investigation de l'hémostase chez certaines espèces animales particulièrement sensibles, telles que le chat. D'après *Norman et al*, sur 359 hémogrammes effectués avec un analyseur automatique à impédance sur des prélèvements récoltés sur tube EDTA sur des chats reçus à University of Glasgow Veterinary Hospital, 256 (71%) montraient une numération plaquettaire inférieure à la limite inférieure de l'intervalle de référence. Pour autant, après estimation du nombre de plaquettes par observation du frottis (*Tasker et al*), seulement 11 (3,1%) présentaient réellement une thrombopénie (<200.10⁹ cellules/L). Ceci est en partie dû au fait que chez le chat, les plaquettes peuvent être trop grandes pour être reconnue par l'analyseur à impédance mais surtout par la forte prévalence d'agrégats plaquettaires (plus de 50 % ici, 66.6% sur 48 chats sains sous anesthésie [*Zelmanovic et al*]). *Byrne et al* ont montré que sur 41 spécimens sanguins provenant de chats, dans 56 % des cas la présence d'agrégats plaquettaires interférait avec le comptage automatique par impédance. La présence d'agrégats plaquettaires interfère également avec le comptage par cytométrie de flux (*Zelmanovic et al*) et le comptage manuel car il est impossible de compter les plaquettes présentes dans les agrégats, de plus, la présence d'agrégats plaquettaires peut mener à une distribution déséquilibrée des plaquettes sur la lame, avec des agrégats se répartissant plutôt sur les bords du frottis. Un comptage précis des plaquettes nécessite donc de s'affranchir de ce phénomène d'agrégation.

L'utilisation de CTAD (citrate, theophylline, adénosine, dipyridamole) a montré des résultats très satisfaisants (*Granat et al.*) mais se révèle difficile à utiliser en hématologie féline de routine notamment du fait de la nécessité de respecter et de prendre en compte le rapport de dilution de 1 volume d'anticoagulant pour 9 volumes de sang. La prostacycline (PGI₂) et son analogue, l'iloprost, ont également montré des résultats encourageants mais nécessitent pour les cliniciens de préparer leurs propres tubes car aucun tube de ce type n'est commercialisé à l'heure actuelle.

D'autres pistes sont également étudiées : le magnésium empêche la liaison du fibrinogène aux plaquettes activées par le collagène et a le potentiel d'inhiber la mobilisation du calcium intracellulaire et du thromboxane A₂ chez les plaquettes activées. Plusieurs études se sont intéressées aux activités anticoagulantes du magnésium in vitro ou in vivo. *Schuff et al.* ont montré une diminution de prévalence des pseudo-thrombocytopénies secondaires à la présence d'agrégats plaquettaires avec utilisation du sulfate de magnésium par rapport à l'EDTA. Les résultats encourageants de ce tube sur la prévalence de pseudothrombopénie en médecine humaine ont donc motivé cette étude. L'objectif a donc été de déterminer si l'ajout de magnésium à l'EDTA permettait d'inhiber la formation d'agrégats plaquettaires et donc d'améliorer les comptages plaquettaires.

2. Personnes impliquées

Amélie Marchand et Françoise Michel : Réalisation des prélèvements

Dr Catherine Trumel : Coordination de l'étude, analyse des prélèvements

Théo Chenal : Regroupement des résultats, analyse des prélèvements, interprétation des résultats

3. Période et durée de l'étude

L'étude se déroule sur des prélèvements récoltés à l'Ecole nationale vétérinaire de Toulouse (ENVT) sur des chats présentés aux cliniques entre juillet et octobre 2020

4. Protocole expérimental

4.1. Recrutement des animaux

Les prélèvements sont réalisés sur des chats présentés en consultation ou hospitalisés à l'ENVT. La nature de leur affection tout comme leur statut sanitaire ou leur stade physiologique ne sont pas des critères de sélection.

4.2. Prélèvements

Les prélèvements sont réalisés par Amélie Marchand ou Françoise Michel. La contention de l'animal est réalisée par un étudiant ou un interne.

A l'aide d'une tondeuse adaptée au chat (silencieuse), un rectangle de 2 cm de long sur 1,5 cm est tondu au niveau de la fosse jugulaire lorsque l'animal n'est pas trop stressé.

La compression est effectuée par la personne qui prélève. Les prélèvements sont effectués avec une aiguille stérile 23Gx5/8" (0.6x16mm) montée sur un corps de prélèvement BD Vacutainer® et récoltés directement dans le tube Sarstedt ThromboExact (S-Monovette® 2,7 ml, 66x11 mm). Un vide est préalablement créé dans le tube en tirant le piston au maximum puis en le cassant. Pour les échantillons témoins, les prélèvements sont récoltés avec le même système mais sur tube EDTA sous vide (Vacumed® 13x75 mm avec K3 EDTA x 3 ml de sang) à la place du ThromboExact.

Chaque tube est ensuite identifié avec le numéro de dossier de l'animal et acheminé directement vers le laboratoire de l'ENVT où il sera analysé.

Lorsque l'animal ne nécessite pas d'analyse hématologique pour sa prise en charge diagnostique, un prélèvement sur tube ThromboExact est prélevé puis un autre sur tube EDTA si le tempérament et la patience de l'animal le permettent. Pour les animaux dont la prise en charge diagnostique nécessite une analyse hématologique, l'ordre des tubes est inversé.

5. Etapes pré-analytiques et analytiques

Deux sous-études sont réalisées : une étude comparative concernant les chats pour lesquels les deux types de tubes ont pu être prélevés et une étude concernant tous les spécimens récoltés sur la période de l'étude.

Chaque tube (EDTA ou Sarstedt) fait l'objet d'une analyse hématologique de routine :

- comptage cellulaire par cytométrie de flux par l'automate d'hématologie (Sysmex XT-V) pour lesquels les résultats sont regroupés dans le logiciel utilisé par les cliniques de l'ENVT (et des autres ENV) : Clovis.

- un frottis sanguin par tube récolté est réalisé au moyen d'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 en verre (pipette pasteur en verre à usage unique, C.E.B., Angers, France) ou d'un tube capillaire en verre pour microhématocrite. Cette goutte est ensuite étalée avec une lame rodée (Menzel-Gläser, lame à bords rodés, LRE, 50x20mm) positionnée à 30°, conformément aux normes C.L.S.I. (Clinical and Laboratory Standard Institute). Les frottis sanguins sont séchés à l'air libre par agitation et sont identifiés avec le numéro de dossier de l'animal ainsi que le numéro de laboratoire et le numéro d'hémogramme. Les frottis sanguins sont colorés et montés dans l'heure suivant leur réalisation au moyen d'une coloration May-Grünwald Giemsa par une coloreuse automatique.

Une lecture des frottis sanguins est réalisée. Un comptage différentiel sur 100 cellules est établi pour chaque frottis. La répartition des cellules, la morphologie et l'aspect quantitatif sont estimés. La présence et la quantité d'agrégats qu'ils soient plaquettaires, leucocytaires, ou leucoplaquettaires est également estimée et notée – (absence), +/- (présence en très faible quantité), + (présence en faible quantité), ++ (présence en quantité modérée), +++ (présence en quantité importante), ++++ (présence en quantité très importante).

Les lames sont toutes analysées les unes à la suite des autres sans interruption afin de limiter au maximum le biais lié à l'estimation de la quantité d'agrégats. Cela permet en effet de s'affranchir des variations de sensibilité de l'observateur suivant le jour de l'analyse. Cela permet également de comparer les différentes lames entre elles et ainsi d'avoir une estimation plus fiable pour chaque lame.

6. Etapes post-analytiques

6.1 Résultats

Les résultats d'analyses sont collectés et retranscrits dans le logiciel Clovis comme pour les analyses effectuées en routine à l'ENVT. Les frottis sont relus une première fois par Théo Chenal puis par le Dr Catherine Trumel et les résultats sont collectés dans deux feuilles de calcul Excel. Une feuille correspond à l'étude comparative et regroupe les résultats pour lesquels un tube EDTA et un tube ThromboExact ont été prélevés (n=16) et l'autre feuille correspond à l'étude portant sur tous les prélèvements effectués sur la période (n=24 pour le tube ThromboExact et n=43 pour le tube EDTA).

6.2 Interprétation des résultats scientifiques – statistiques

Les calculs statistiques sont effectués grâce au logiciel Excel et l'outil Reference Value Advisor macroinstructions (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA).

7. Bibliographie

Byrne RF, Andrews CM, Libretto SE, et al. Canine and feline haematology analysis: comparative performance of Technicon H*1 and AVL MS8 VET analysers. *Comp Haematol Int*. 1994;4: 212-217.

Granat F, Monzali C, Jeunesse E, Guerlin M, Trumel C, Geffré A, Bourgès-Abella N. Comparison of different anticoagulant associations on haemostasis and biochemical analyses in feline blood specimens. *J Feline Med Surg*. 2017 Apr;19(4):394-402. doi: 10.1177/1098612X16628579. Epub 2016 Jul 9. PMID: 26887655.

Norman EJ, Barron RC, Nash AS, Clampitt RB. Prevalence of low automated platelet counts in cats: comparison with prevalence of thrombocytopenia based on blood smear estimation. *Vet Clin Pathol*. 2001;30(3):137-140. doi: 10.1111/j.1939-165x.2001.tb00422.x. PMID: 12024313; PMCID: PMC7488585.

Schuff-Werner P, Steiner M, Fenger S, Gross HJ, Bierlich A, Dreissiger K, Mannuß S, Siegert G, Bachem M, Kohlschein P. Effective estimation of correct platelet counts in pseudothrombocytopenia using an alternative anticoagulant based on magnesium salt. *Br J Haematol*. 2013 Sep;162(5):684-92. doi: 10.1111/bjh.12443. Epub 2013 Jun 29. PMID: 23808903; PMCID: PMC3796857.

Tasker S, Cripps PJ, Mackin AJ. Estimation of platelet counts on feline blood smears. *Vet Clin Pathol*. 1999;28(2):42-45. doi: 10.1111/j.1939-165x.1999.tb01041.x. PMID: 12075521.

Zelmanovic D, Hetherington EJ. Automated analysis of feline platelets in whole blood, including platelet count, mean platelet volume, and activation state. *Vet Clin Pathol*. 1998;27:2-9.

Annexe 2 : Matériel de prélèvement

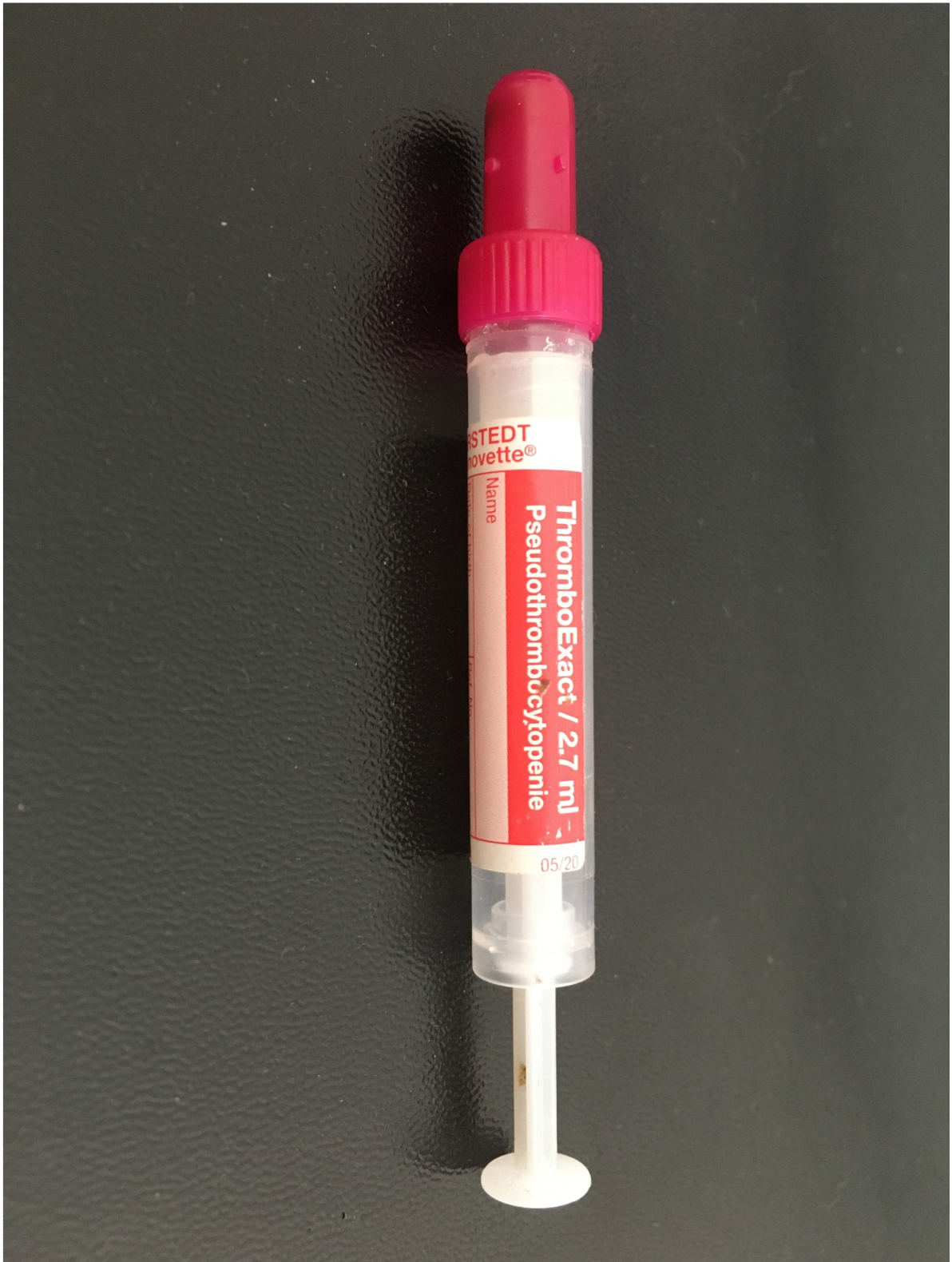


Figure 9: Tube ThromboExact® (photographie personnelle)

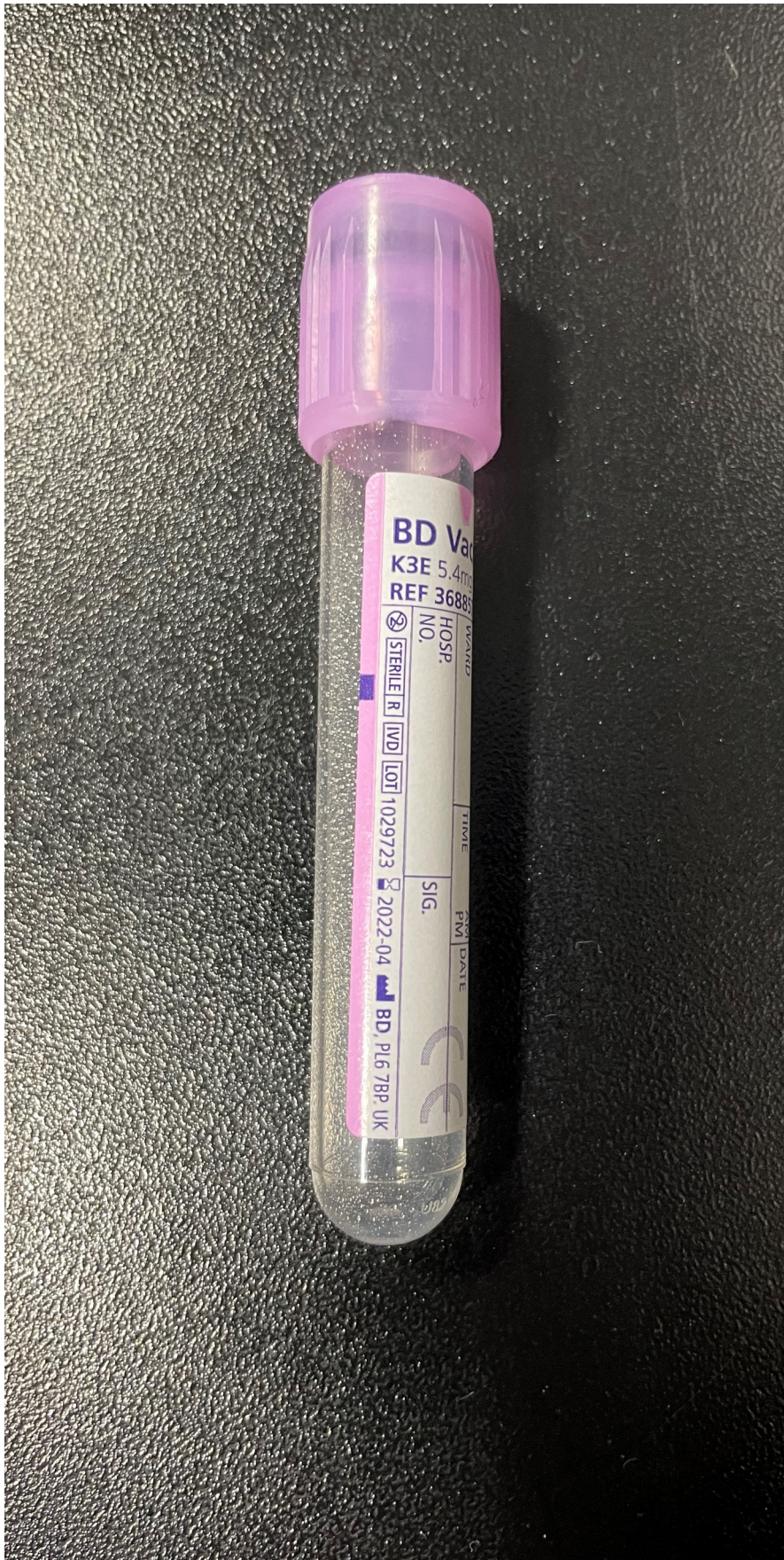


Figure 10 : Tube K3-EDTA (photographie personnelle)



Figure 11: Matériel de prélèvement démonté (de gauche à droite : porte tube, aiguille 23G (0,6x16mm), adaptateur)



Figure 12: Matériel de prélèvement monté

	n	Mean	95% CI	SE	SD				
PLTO	32	265,9	225,5 to 306,4	19,83	112,18				
PLTO E	16	267,6	200,7 to 334,5	31,39	125,56				
PLTOT	16	264,3	210,3 to 318,2	25,29	101,18				

	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IGR
PLTO	32	37	188,4	264,0	205,0 to 336,0	369,0	451	180,6
PLTO E	16	37	177,8	264,5	174,0 to 392,0	387,0	451	209,3
PLTOT	16	70	199,8	261,0	196,0 to 336,0	330,2	443	130,4

Test	Compare Pairs - Paired t-test				Date
Performed by	List dataset Plt: PLTO E PLTO T Jean-Pierre Braun				19 juillet 2021

Plt	n	Mean	SE	SD
PLTO E	16	267,56	31,389	125,56
PLTOT	16	264,25	25,295	101,18
Difference (PLTO E - PLTOT)	16	3,31	27,823	111,29

Mean difference	3,31
95% CI	-55,99 to 62,62
SE	27,823
t statistic	0,12
DF	15
2-tailed p	0,9068

Test	Compare Pairs - Wilcoxon test				Date
Performed by	List dataset with 2 repeat measurements Plt: PLTO E PLTO T Jean-Pierre Braun				19 juillet 2021

Difference between pairs	n	Rank sum	Mean rank
Positive	13	91,0	7,00
Negative	2	29,0	14,50
Zero	1		

Median difference	30,00
95.6% CI	-72,00 to 57,50 (exact)
Wilcoxon's statistic	91,0
Z statistic	-
2-tailed p	0,0833 (exact tables used, 13% ties)

Tableau 5 : Test Wilcoxon et t-paired, numération plaquettaire en fonction de l'anticoagulant (Comp)

Test		Correlation - Spearman		v2.30	
performed by	Agr Plt v PLTO Moy. rs = 0	Jean-Pierre Braun		Date	19 juillet 2021
n	15	(cases excluded: 1 due to missing values)			
rs statistic	-0,63				
95% CI	-0,86 to -0,17	(normal approximation)			
t statistic	-2,83				
DF	13				
2-tailed p	0,0126	(t approximation, corrected for ties)			

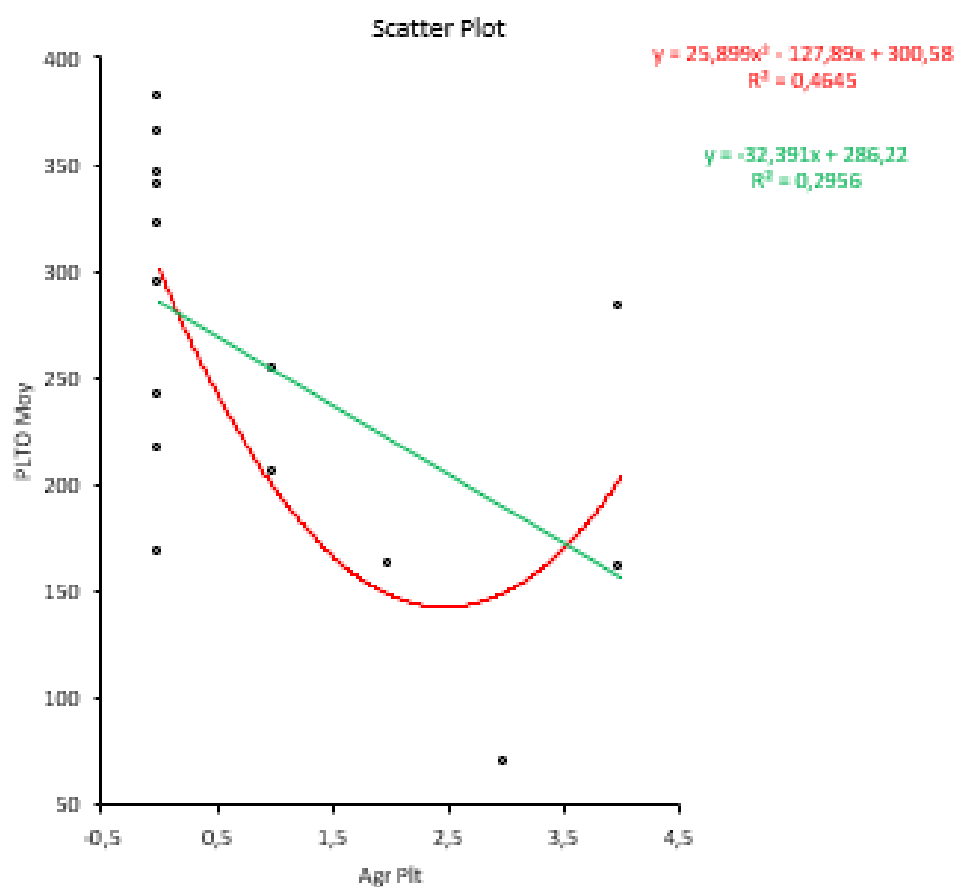


Tableau 6 : Corrélation de Spearman entre la présence d'agrégats plaquettaires et la numération plaquettaire (Comp)

Test	Correlation - Spearman		
Performed by	AgPlt v PLTO. rs = 0	Date	19 juillet 2021
	Jean-Pierre Braun		

n	67		
rs statistic	-0,43		
95% CI	-0,61 to -0,21	(normal approximation)	
t statistic	-3,87		
DF	65		
2-tailed p	0,0003	(t approximation, corrected for ties)	

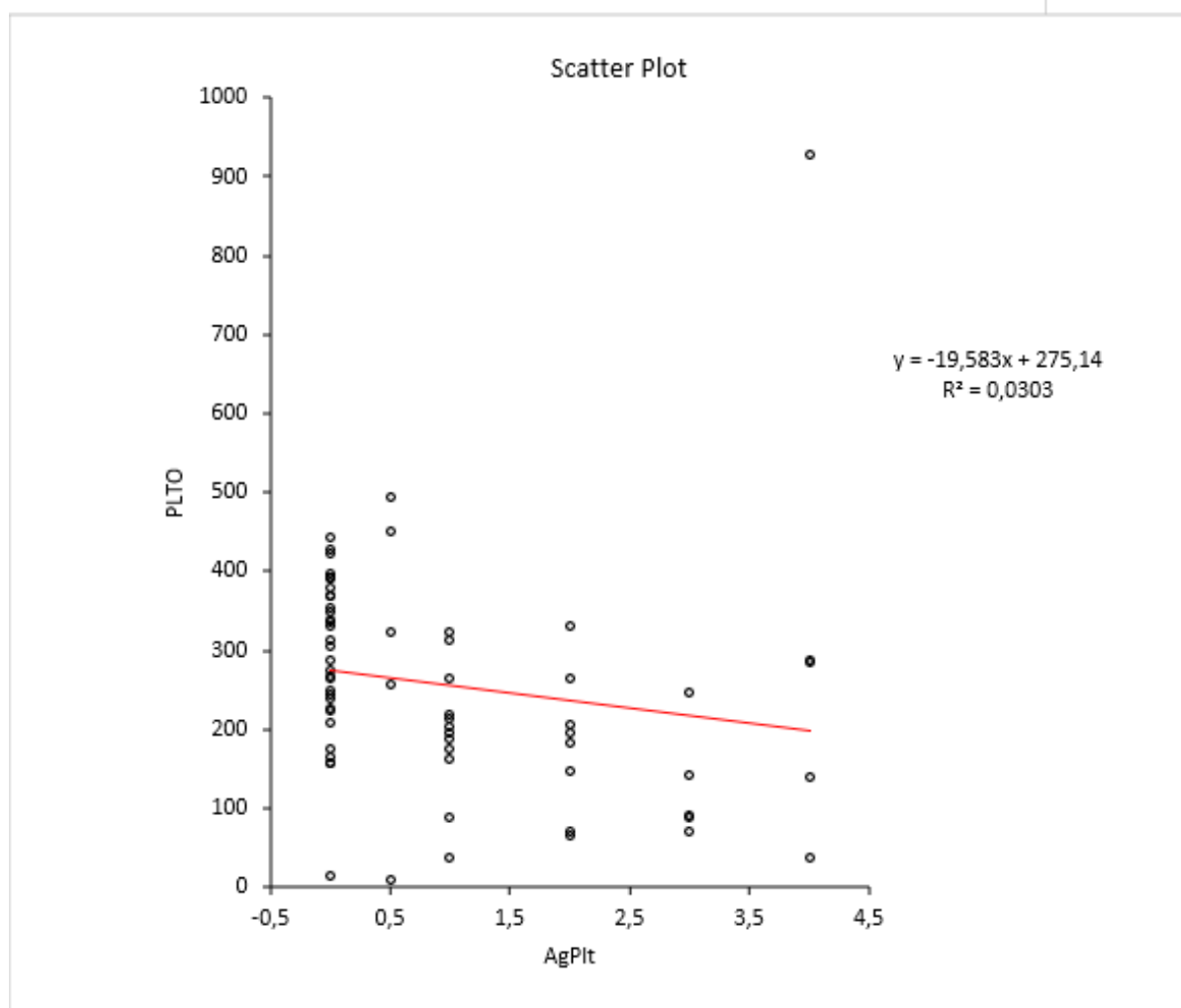


Tableau 7 : Corrélation de Spearman entre la présence d'agrégats plaquettaires et la numération plaquettaire (Per)

Test	Correlation - Spearman		Date	19 juillet 2021
Performed by	AgnLeuP v PLTO. rs = 0,00 Jean-Pierre Braun			
n	67			
rs statistic	0,00			
95% CI	-0,24 to 0,24 (normal approximation)			
t statistic	0,00			
DF	65			
2-tailed p	0,9971 (t approximation, corrected for ties)			

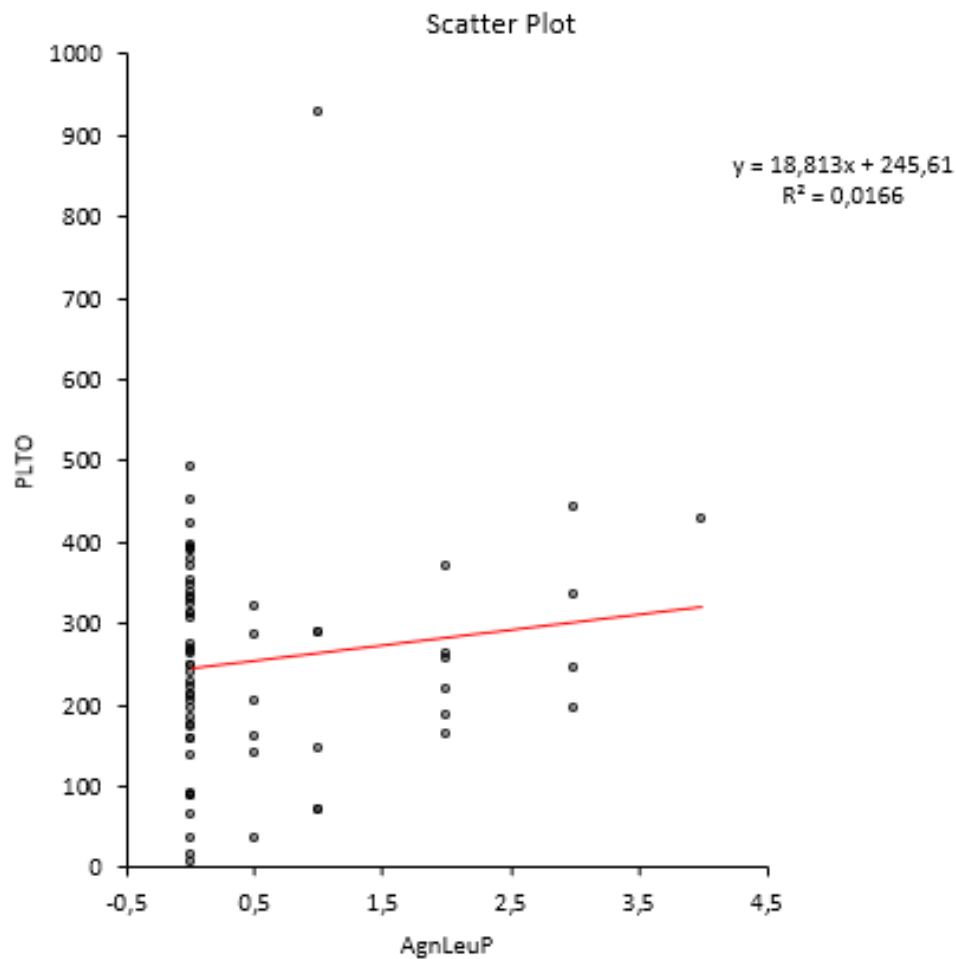


Tableau 8 : Corrélation de Spearman entre la présence d'ALP et la numération plaquettaire (Per)

Test	Correlation - Spearman	
performed by	Agr LP v PLTO THBXT. rs = 0,40	
	Jean-Pierre Braun	Date
		19 juillet 2021

n	11 (cases excluded: 5 due to missing values)	
rs statistic	0,40	
95% CI	-0,26 to 0,81 (normal approximation)	
t statistic	1,31	
DF	9	
2-tailed p	0,2210 (t approximation, corrected for ties)	

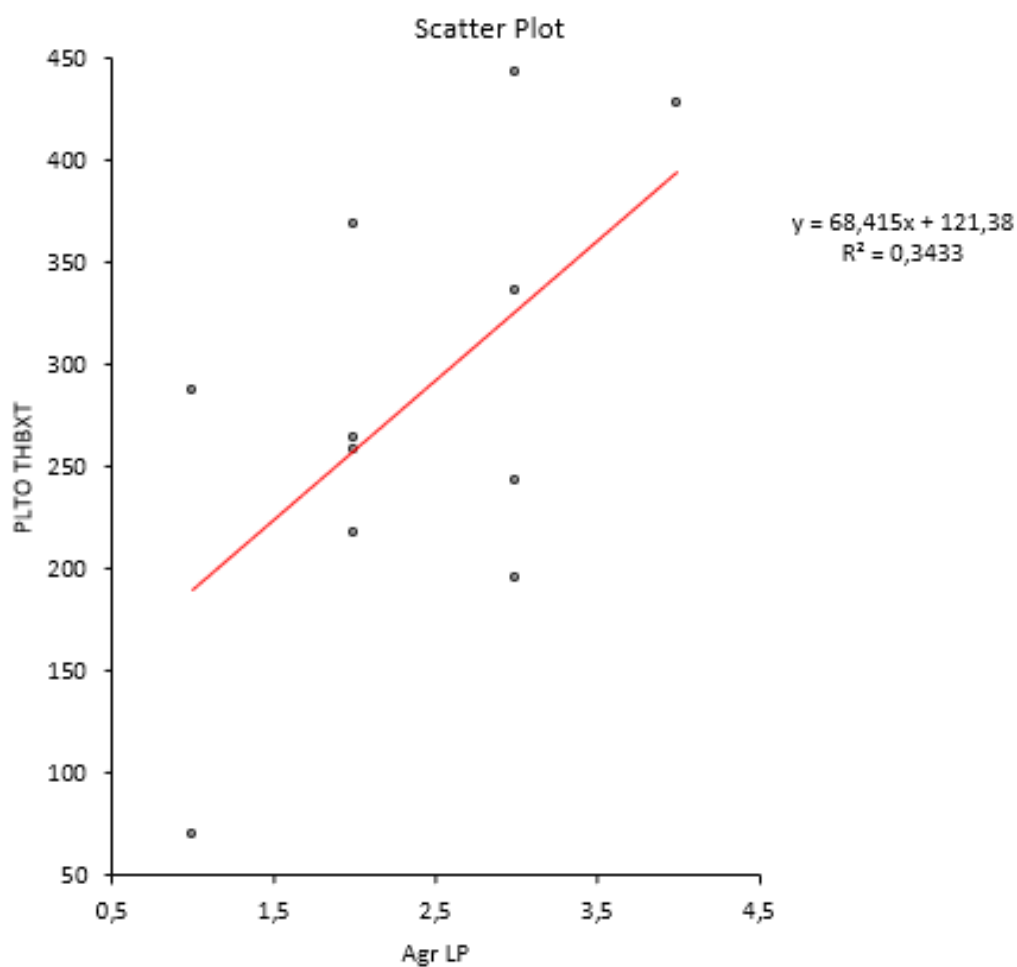


Tableau 9 : Corrélation de Spearman entre la présence d'ALP et la numération plaquettaire (Comp)

	n	Mean	95% CI	SE	SD			
AgPlt E	43	0,73	0,38 to 1,09	0,176	1,151			
AgPlt T	24	1,42	0,84 to 2,00	0,280	1,373			
	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
AgPlt E	43	0,0	0,00	0,00	0,00 to 1,00	1,00	4,0	1,00
AgPlt T	24	0,0	0,00	1,00	0,00 to 2,00	2,00	4,0	2,00
Test Compare Groups - Mann-Whitney test as 1-way table dataset Agrégats plaquettaires: AgPlt E ¹ AgPlt T Performed by Jean-Pierre Braun Date 19 juillet 2021								
plaquettaire	n	Rank sum	Mean rank	U				
AgPlt E	43	1292,5	30,06	685,5				
AgPlt T	24	985,5	41,06	346,5				
Median difference	-0,50							
95.0% CI	-1,00 to 0,00			(normal approximation)				
Mann-Whitney's statistic	685,5							
Z statistic	-2,36							
2-tailed p	0,0183			(normal approximation, corrected for ties)				

Tableau 10 : Test Mann-Whitney score agrégats plaquettaires en fonction de l'anticoagulant (Per)

	n	Mean	95% CI	SE	SD				
ScAg	32	1,14	0,63 to 1,65	0,250	1,416				
ScAg E	16	0,97	0,19 to 1,75	0,366	1,466				
ScAg T	16	1,31	0,57 to 2,05	0,347	1,389				
	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR	
ScAg	32	0,0	0,00	0,50	0,00 to 2,00	2,00	4,0	2,00	
ScAg E	16	0,0	0,00	0,00	0,00 to 2,00	1,58	4,0	1,58	
ScAg T	16	0,0	0,00	1,00	0,00 to 2,00	2,00	4,0	2,00	
Test	Compare Pairs - Paired t-test					v2.30			
	List dataset								
	ScAg Plt: ScAg E * ScAg T								
Performed by	Jean-Pierre Braun			Date	19 juillet 2021				
n	16								
	n	Mean	SE	SD					
ScAg Plt	16	0,97	0,366	1,47					
ScAg E	16	1,31	0,347	1,39					
Difference (ScAg E - ScAg T)	16	-0,34	0,427	1,71					
Mean difference	-0,34								
95% CI	-1,25 to 0,57								
SE	0,427								
t statistic	-0,80								
DF	15								
2-tailed p	0,4339								
Test	Compare Pairs - Wilcoxon test								
	List dataset								
	ScAg Plt: ScAg E * ScAg T								
Performed by	Jean-Pierre Braun			Date	19 juillet 2021				
n	16								
Difference between pairs	n	Rank sum	Mean rank						
Positive	4	25,5	6,38						
Negative	8	52,5	6,56						
Zero	4								
Median difference	-0,50								
95.6% CI	-1,00 to 0,25 (exact)								
Wilcoxon's statistic	25,5								
Z statistic	-								
2-tailed p	0,3394 (exact tables used, 100% ties)								

Tableau 11 : Test Wilcoxon et t-paired, score agrégat plaquettaire en fonction de l'anticoagulant (Comp)

	n	Mean	95% CI	SE	SD
AgnLeuPE	43	0,03	-0,02 to 0,09	0,026	0,169
AgnLeuPT	24	1,48	1,00 to 1,96	0,232	1,137

	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
AgnLeuPE	43	0,0	0,00	0,00	0,00 to 0,00	0,00	1,0	0,00
AgnLeuPT	24	0,0	0,50	1,00	0,50 to 2,00	2,00	4,0	1,50

Test		Compare Groups - Mann-Whitney test				
		as 1-way table dataset				
Performed by		Agréégats leucoplaquettaires: AgnLeuP E 1 AgnLeuP T				
		Jean-Pierre Braun				
		Date				
		19 juillet 2021				

	n	67
leucoplaquet	n	Rank sum
AgnLeuPE	43	1023,5
AgnLeuPT	24	1254,5
		Mean rank
		U
		954,5
		77,5

Median difference	-1,00
95.0% CI	-2,00 to -1,00 (normal approximation)

Mann-Whitney's statistic	954,5
--------------------------	-------

Z statistic	-6,78
2-tailed p	<0.0001 (normal approximation, corrected for ties)

Tableau 12 : Test Mann-Whitney score ALP en fonction de l'anticoagulant (Per)

	n	Mean	95% CI	SE	SD				
Ag LP	32	0,94	0,51 to 1,37	0,212	1,196				
Ag LP E	16	0,09	-0,05 to 0,24	0,068	0,272				
Ag LP T	16	1,78	1,16 to 2,40	0,292	1,169				

	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
Ag LP	32	0,0	0,00	0,50	0,00 to 1,00	2,00	4,0	2,00
Ag LP E	16	0,0	0,00	0,00	0,00 to 0,00	0,00	1,0	0,00
Ag LP T	16	0,5	0,50	2,00	0,50 to 3,00	3,00	4,0	2,50

Test	Compare Pairs - Paired t-test	
Performed by	List dataset ScAg LeucoPlt: Ag LP E · Ag LP T Jean-Pierre Braun	
Date	19 juillet 2021	

	n	Mean	SE	SD
ScAg	16	0,09	0,068	0,27
Ag LP E	16	1,78	0,292	1,17
Ag LP T	16	-1,69	0,319	1,28
Difference (Ag LP E - Ag LP T)	16	-1,69	0,319	1,28

Mean difference	-1,69
95% CI	-2,37 to -1,01
SE	0,319
t statistic	-5,29
DF	15
2-tailed p	<0.0001

Test	Compare Pairs - Wilcoxon test	
Performed by	List dataset ScAg LeucoPlt: Ag LP E · Ag LP T Jean-Pierre Braun	
Date	19 juillet 2021	

	n	Rank sum	Mean rank
Difference between pairs	16		
Positive	0	0,0	-
Negative	14	105,0	7,50
Zero	2		

Median difference	-1,75
95.6% CI	-2,50 to -1,00 (exact)
Wilcoxon's statistic	0,0
Z statistic	-
2-tailed p	0,0001 (exact tables used, 86% ties)

Tableau 13 : Test Wilcoxon et t-paired score ALP en fonction de l'anticoagulant (Comp)

NOM : CHENAL

Prénom : Théo

TITRE : INTÉRÊT DE L'UTILISATION DES TUBES THROMBOEXACT® POUR LIMITER LA PRÉSENCE D'AGRÉGATS PLAQUETTAIRES LORS DE L'ANALYSE HÉMATOLOGIQUE CHEZ LE CHAT

RÉSUMÉ : La présence d'agrégats plaquettaires est l'un des principaux obstacles à l'obtention d'un spécimen de bonne qualité pour une analyse hématologique dans l'espèce féline. De nombreuses observations d'agrégats avec ou sans pseudothrombopénie associée sont rapportées avec l'utilisation d'EDTA chez le chat avec une prévalence supérieure à 50 %. Plusieurs anticoagulants ont déjà été testés avec des résultats satisfaisant comme le CTAD ou l'Iloprost mais sont difficilement utilisables en routine. Par ailleurs, le tube ThromboExact®, Sarstedt ; à base de MgSO₄ a montré des résultats très satisfaisants sur la prévention d'agrégats plaquettaires chez l'Homme atteint de pseudothrombopénie induite par les anticoagulants.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'intérêt de l'utilisation du tube ThromboExact® dans l'espèce féline pour limiter la présence d'agrégats plaquettaires en vue d'une potentielle utilisation en médecine vétérinaire de routine.

La première partie de cette thèse est une étude bibliographique sur les propriétés antiagrégantes du sulfate de magnésium et l'utilisation du tube ThromboExact® chez l'Homme notamment en cas de pseudothrombopénie induite par les anticoagulants.

La deuxième partie correspond à l'étude expérimentale réalisée entre juillet et octobre 2020 à partir de spécimens sanguins récoltés sur des chats présentés aux cliniques de l'ENVT. Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative au niveau de la présence d'agrégats plaquettaires entre l'utilisation du tube ThromboExact® et d'un tube K3-EDTA. Par ailleurs de nombreux agrégats leuco-plaquettaires ont été observés avec l'utilisation du tube ThromboExact®. L'utilisation de ce tube en hématologie féline n'a donc pas d'intérêt.

MOTS-CLÉS : AGREGAT PLAQUETTAIRE, AGREGAT LEUCO-PLAQUETTAIRE, SULFATE DE MAGNESIUM, THROMBOEXACT, HEMATOLOGIE, CHAT.

ENGLISH TITLE : BENEFIT OF USING THROMBOEXACT® TUBES TO REDUCE THE PRESENCE OF PLATELET AGGREGATES IN HAEMATOLOGICAL ANALYSIS IN CATS

ABSTRACT : Presence of platelet aggregates is one of the primary obstacles to obtaining a specimen of good quality for haematological analysis in cats. Many observations of platelet aggregates with or without associated pseudothrombocytopenia have been reported in with the use of EDTA in cats with a prevalence of more than 50%. Several anticoagulants such as CTAD or Iloprost® have already been tested and shown satisfactory results, but these are not easily used in routine haematology. ThromboExact®, Sarstedt ; magnesium sulfate-based tubes have shown very satisfactory results in preventing platelet aggregates formation in human with anticoagulant dependent pseudothrombocytopenia.

The aim of this work is to study the benefit of using ThromboExact® tubes in cats to reduce the presence of platelet aggregates and its potential for use in routine veterinary medicine.

The first part of this thesis is a review of the current literature on the antiaggregant properties of magnesium sulfate and the use of ThromboExact® tube in humans, particularly in the case of anticoagulant dependent pseudothrombocytopenia.

The second part is a prospective study performed between July and October 2020 using blood specimens collected from cats presented to the teaching hospital of ENVT. The results obtained showed no significant difference between the use of a ThromboExact® tube and a K3-EDTA tube in the quantity of platelet aggregates. In addition, numerous leukoplatelet aggregates were observed with the ThromboExact® tube. Therefore, the use of this tube in feline haematology has no benefit.

KEYWORDS : PLATELET AGGREGATE, LEUKOPLATELET AGGREGATE, MAGNESIUM SULFATE, THROMBOEXACT, HAEMATOLOGY, CAT.