

P3604

## CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PLAQUETTES DANS L'ESPECE PORCINE

SAVEY M. (1), BONEU B. (2), ESPINASSE J. (1)

(1) *Laboratoire Central d'Hématologie-Hémostase - Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de Basse-Cour  
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*

(2) *Laboratoire Central d'Hémostase - C.H.R. Purpan - Toulouse*

### I. INTRODUCTION

Poursuivant l'étude de la fonction hémostatique chez le porc (6), nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux plaquettes sanguines, éléments particulièrement importants du phénomène hémostatique. De nombreuses études ont en effet montré le rôle qu'elles jouaient dans la physiopathologie de nombreuses affections ou syndromes, aussi bien en clinique humaine (maladies thrombo-emboliques, Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée) que porcine : mise en évidence de C.I.V.D. au cours de l'entérite hémorragique (7), altérations morphologiques constatées au microscope électronique dans les plaquettes de porcs atteints de troubles de l'hémostase (8), rétention des plaquettes sur billes de verre diminuée chez des porcs atteints de maladie de Von Willebrand (12).

Bien que ne possédant pas de noyau, la plaquette a une vie propre très intense. Son quotient respiratoire est voisin de l'unité, soit 50 fois supérieur à celui du globule rouge. Elle agit sur la perméabilité vasculaire par libération de prostaglandines (15). La glycolyse essentiellement anaérobie (Voie d'Embden-Meyerhof) produit l'énergie nécessaire aux fonctions (5) qui lui permettent de jouer son rôle primordial dans l'hémostase : adhésion au verre et au collagène, agrégation aussi bien provoquée par le virus de la Maladie de Newcastle que par l'A.D.P. ou l'adrénaline, libération enfin de divers médiateurs (release réaction). Le microscope électronique révèle sa richesse structurale en permettant d'observer lysosomes, mitochondries et vacuoles. De nombreuses recherches entreprises depuis les travaux de WRIGHT (1942) (14) et de WEBBER et FIRKIN (1965) (13) ont conduit à la notion d'hétérogénéité plaquettaire : les thrombocytes ne sont pas tous semblables entre eux, il existe des différences fonctionnelles et morphologiques qui permettent de les séparer en catégories ou "populations".

De nombreuses techniques ont été proposées et appliquées aussi bien chez l'homme que chez l'animal (en particulier le chien) pour isoler ces différentes populations afin de mieux les étudier. Elles reposent toutes sur la séparation de plaquettes de densités différentes par centrifugation sur des gradients continus ou discontinus de silicone, d'huiles inertes ou de sucres.

Nous nous sommes attachés quant à nous à une méthode mise au point par BONEU et Coll. (1) à la suite de BOOYSE et RAFELSON (2) (3) : l'ultracentrifugation d'un Plasma Riche en Plaquettes (P.R.P.) sur gradient continu de saccharose. Il nous a semblé, de plus, intéressant, dans le cadre de cette étude, d'examiner la distribution des volumes plaquettaires au sein d'un grand nombre de ces éléments afin de calculer un volume moyen et de comparer ces données à celles déjà connues chez l'homme.

### II. MATERIEL ET METHODES

1/ **LES PORCS** utilisés sont des procs nains, de race PITMAN-MOORE, couramment employés en pathologie expérimentale et comparée. Le sang (20 ml) est obtenu par ponction de la veine cave antérieure. Il est prélevé à l'aide d'un matériel à usage unique en matière plastique. L'anticoagulant utilisé est le liquide d'Aster ou solution A.C.D.\* à raison d'un millilitre d'anticoagulant pour 4 ml de sang.

\* Acide citrique : 1,36 g, Citrate disodique : 3,03 g, glucose anhydre : 2 g, Q.S.P. 100 ml d'eau distillée.

## 2/ ULTRACENTRIGUATION SUR GRADIENT LINEAIRE ET CONTINU DE SACCHAROSE (4) :

Ce gradient continu de saccharose est réalisé à l'aide d'un appareillage type BUCHLER. Celui-ci permet d'obtenir sous un volume de 15 cm<sup>3</sup> un gradient linéaire et continu de saccharose de haut en bas d'un tube de 2,5 cm de diamètre et de 5 cm de hauteur. La concentration la plus forte (65 %) est située en bas et la plus faible (50 %) en haut du tube. Au-dessus de cette dernière, il est déposé 3 à 4 ml de saccharose à une concentration de 30 % de façon à séparer les protéines plasmatiques de la première population plaquettaire.

La préparation plaquettaire testée est constituée par un P.R.P. obtenu par centrifugation 900 t/mn (150 g) pendant 10 mn. Ce P.R.P. est à nouveau centrifugé dans les mêmes conditions. Le surnageant (Plasma Pauvre en Plaquettes) est jeté et le culot plaquettaire remis en suspension dans 0,6 ml d'une solution contenant 5 volumes de sérum physiologique pour un volume de liquide d'Aster. Toutes les manipulations ont lieu à la température de la pièce.

Cette suspension qui contient environ 10<sup>9</sup> plaquettes est ensuite déposée sur la couche de saccharose à 30 %. L'ensemble est soumis à une ultracentrifugation 55.000 g pendant 1 heure à la température de 4°C. Le contenu est alors aspiré à travers un photomètre ultra-violet (longueur d'onde 254 nm) en circulation continue à un débit de 1ml/mn. Le résultat est transcrit sur un enregistreur qui exprime les variations de densité optique (proportionnelles au nombre de plaquettes) en ordonnée, en fonction du volume du gradient aspiré en abscisse.

## 3/ ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DES VOLUMES PLAQUETTAIRES (10) :

La préparation plaquettaire utilisée est un P.R.P. obtenu dans les mêmes conditions que précédemment. Il est dilué dans 20 ml d'un soluté isotonique spécialement préparé pour ces manipulations (ISOTON "COULTRONICS"). Les manipulations sont effectuées à la température du Laboratoire. Ces conditions ne modifient pas du tout la forme et le volume des plaquettes.

L'appareil comprend trois modules :

- Un compteur de particules : COULTER COUNTER Modèle Z.BIC, qui permet de compter le nombre de plaquettes contenues dans le volume d'aspiration (0,5 ml), chacune d'entre-elles déterminant une impulsion électrique dont la hauteur est proportionnelle au volume ;
- Un analyseur multicanaux : CHANNELYSER C 1000, qui recueille les informations du premier module, classe automatiquement les impulsions en fonction de leur taille et les comptabilise de manière à fournir les résultats sous forme d'un histogramme de 100 classes ou canaux ;
- Enfin, un troisième module enregistreur permet de transcrire la courbe fournie par le deuxième module sur un papier (100 classes de volume en abscisse - nombre de plaquettes en ordonnée).

Ces appareils sont utilisés selon la méthode décrite par PAULUS (9) et permettent d'obtenir le volume moyen et le volume modal de chaque échantillon testé.

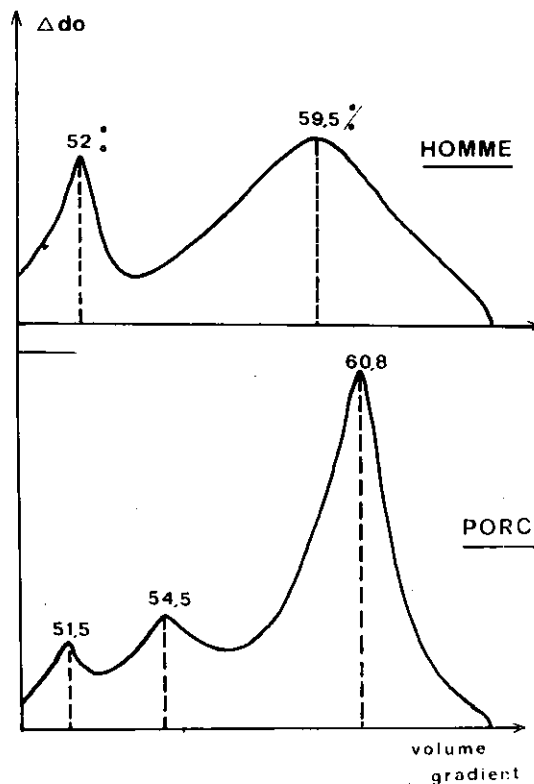
## III. RESULTATS

### 1/ EXPLORATION DES DENSITES PLAQUETTES :

Les diagrammes obtenus (figure 1) montrent plusieurs pics. Chez le porc trois pics peuvent être identifiés alors que chez l'homme deux seulement sont mis en évidence.

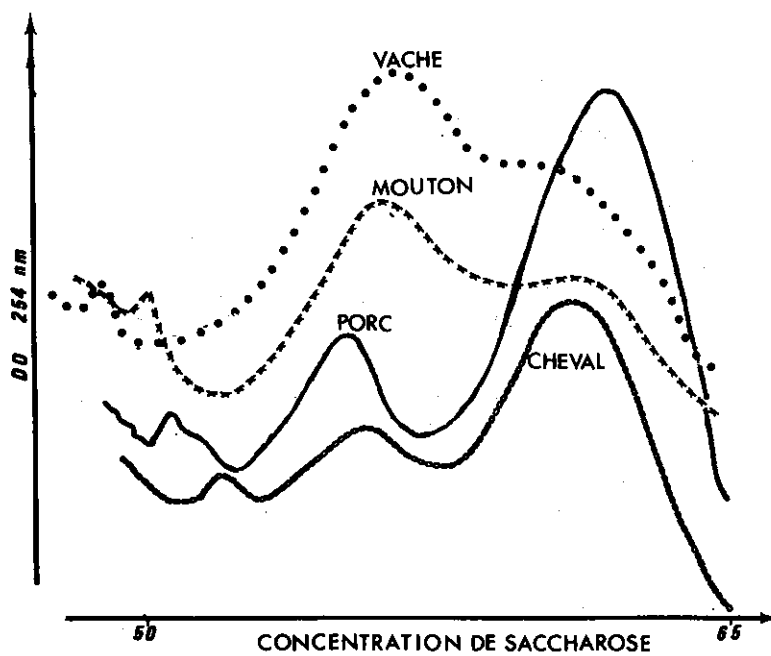
Le pic qui se situe dans les densités les plus faibles correspond au pic A de BOOYSE et RAFELSON (2) (3). Il se trouve pratiquement au même endroit (entre 51,5 % et 52,5 %) quelle que soit l'espèce animale. Sa signification artefact ou population plaquettaire est discutée. Le porc possédant deux autres pics est semblable à la plupart des espèces animales (cheval, mulet, âne, chèvre, mouton, lapin néo-zélandais) qui elles aussi possèdent 2 pics, mais à des niveaux sensiblement différents selon chaque espèce (figure 2).

**FIGURE 1**  
**DISTRIBUTION DES "POPULATIONS PLAQUETTAIRES" SUR GRADIENT CONTINU, A PARTIR D'UN PLASMA RICHE EN PLAQUETTES (PRP)**



**fig 1** Distribution des "populations plaquettaires" sur gradient continu, à partir d'un plasma riche en plaquettes (PRP).

**FIGURE 2**  
**DISTRIBUTION DES PLAQUETTES SUR GRADIENT CONTINU DE SACCHAROSE**



Les plaquettes de 4 porcs examinées selon cette technique ont permis de vérifier la constance de ces résultats (cf. tableau 1).

TABLEAU 1

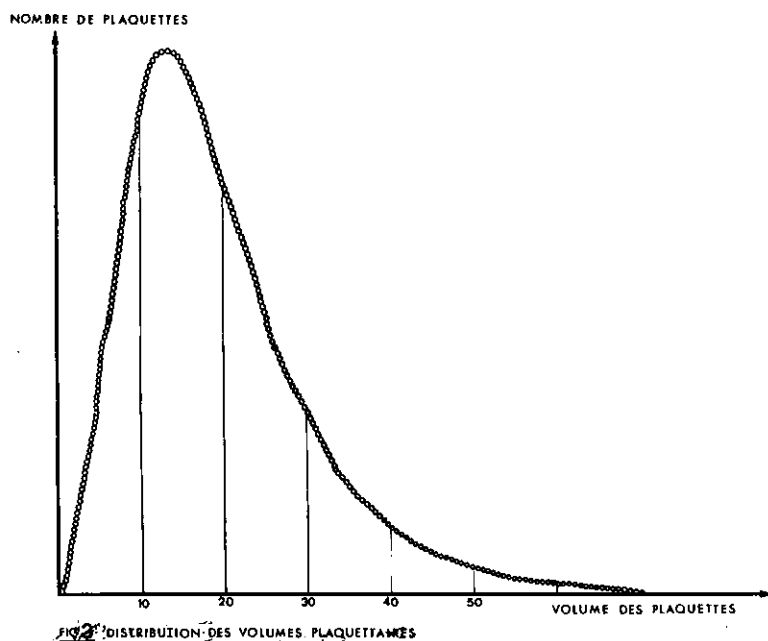
	CONCENTRATION EN SACCHAROSE CORRESPONDANT A CHAQUE PIC PLAQUETTAIRE		
	EQUIVALENT A de BOOYSE & RAFELSON	AUTRES PICS	
HOMME	52		59
PORC NAIN	51,5	54,5	60,8
	52,5	55,5	60
	"	55,5	59,2
	"	56	60,5

## 2/ EXPLORATION DES VOLUMES PLAQUETTAIRES :

Le type de courbe obtenu est conforme à celui de la figure 3.

FIGURE 3

DISTRIBUTION DES VOLUMES PLAQUETTAIRES



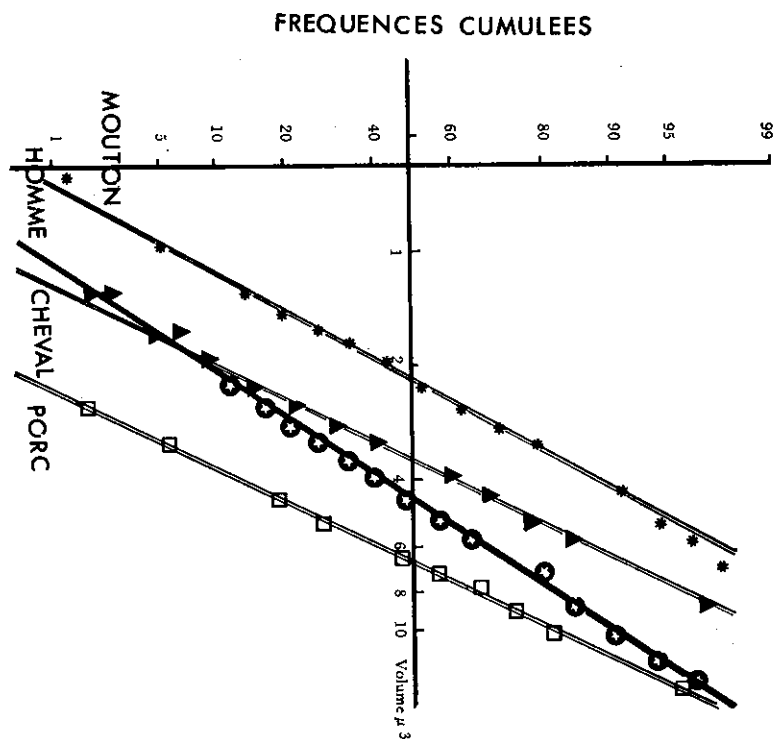
Le volume modal est de 6,7 microns-cube pour un volume moyen plaquettaire de 8,3 microns-cube. Le porc appartient donc à la catégorie des espèces macro-plaquettaires par rapport à l'homme (volume modal 5,8 microns-cube, volume moyen 7,3 microns-cube) comme le chien et le chat.

Il convient de noter que l'allure de la courbe de distribution des volumes plaquettaires est remarquablement constante quelle que soit l'espèce : asymétrique, mode unique, déviée à gauche.

De plus, chez l'homme comme chez le porc, les résultats exprimés en fréquence cumulée des log-volumes plaquettaires (méthode graphique de HENRY (11) ) montrent une distribution des log-volumes normale (fig. 4).

FIGURE 4

DISTRIBUTION GAUSSIENNE DES LOG VOLUMES  
CHEZ QUELQUES ESPECES DOMESTIQUES



#### IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

Au-delà d'une meilleure connaissance des plaquettes du porc, ces expériences ont montré chez celui-ci, comme chez la plupart des autres animaux, l'existence d'une double population plaquettaire en lieu et place de l'unique population humaine (la fraction A n'étant pas considérée du fait de sa signification discutée). Le fait pour l'instant ne peut être expliqué. Il faut cependant noter que l'homme atteint de désordres myéloprolifératifs présente une remarquable augmentation de la fraction A jusqu'à imiter l'image des doubles populations rencontrées chez l'animal.

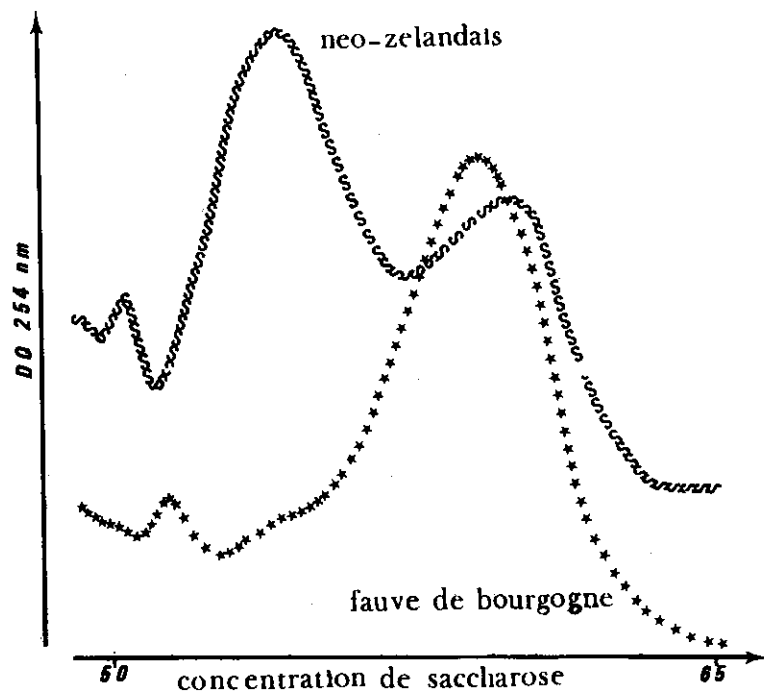
Le porc, comme la plupart des autres espèces testées, possède une distribution de log-volumes plaquettaires gaussienne mais s'en distingue par une macro-plaquettose par rapport à l'homme.

L'ensemble de ces connaissances peut être utilisé en pathologie comparée afin de comprendre et d'expliquer l'hétérogénéité plaquettaire.

L'observation chez le lapin de différences intra-spécifiques dans le profil plaquettaire (figure 5) : présence d'une seule population chez le Fauve de Bourgogne et de deux chez le Néo-Zélandais, nous incite à poursuivre nos études chez le porc à la recherche de constatations semblables.

(voir figure 5, page suivante)

FIGURE 5  
DISTRIBUTION DES PLAQUETTES DE LAPINS



#### BIBLIOGRAPHIE

1. BONEU (B.), PRIS (J.), SAVEY (M.), ESPINASSE (J.), BIERME (R.). Platelets distribution in linear sucrose gradient, studies, in man and other animal species - à paraître - Excerpta Medica Proceedings of a international symposium on blood platelets, Sept. 74, ISTAMBUL.
2. BOOYSE (F.M.), HOVEKE (T.P.), RAFELSON (M.E.). Studies on human platelets. Protein synthetic activity of various platelet populations. *Biochim. Biophys. Acta (Amst)*, 1968, **157**, 660-775.
3. BOOYSE (F.M.), ZSCHOCKE (D.), HOVEKE (T.P.), RAFELSON (M.E.). Studies on human platelets. IV. - Protein synthesis in maturing human platelets. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 1971, **26**, 167-178.
4. DELCOUR (L.). Les populations plaquettaires du mouton et d'autres animaux domestiques. Th. Doc. Vet. Toulouse, 1974.
5. DEYKIN (D.). Emerging concepts of platelet function. *New England Journal of Medicine*, 1974, **290**, 137-140.
6. ESPINASSE (J.), BONEU (B.), TESSANDIER (G.). Etude systématique de l'hémostase dans l'espèce porcine. IIIème Congrès International de Médecine Vétérinaire Porcine ; Lyon, 12, 13, 14 juin 1974.
7. ESPINASSE (J.), CABANIE (P.), VAN HAVERBEKE (G.), RAYNAUD (J.P.). Identification du syndrome de coagulation intravasculaire disséminée dans l'entérite hémorragique du porc. *Rev. Med. Vet.*, 1973, **124**, 6, 756-776.
8. KAHN (R.A.), COOPER (R.G.), CORNELL (N.), MUHRER (M.E.). Electron microscopy of Bleeder swine platelets. *Am. J. Vet. Res.*, 1970, **31**, 4, 679-684.
9. PAULUS (J.M.). Production et destruction des Plaquettes sanguines. 1 Volume, MASSON Editeur, 1974 Paris.

10. SAVEY (M.). Volume et densité plaquettaires chez les animaux domestiques. Essai d'interprétation. Th. Doc. Vet., Toulouse, 1975.
11. SCHARWITZ (D.). Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 1 Volume, 3ème Edition, 1972, Flammarion, Editeur.
12. WALTER BOWIE (E.J.), OWEN (C.A.), ZOLLMAN (P.E.), THOMPSON (J.M.), EARS (D.N.). Tests of hemostasis in Swine : Normal Values and Values in pigs affected with von Willebrand's disease. Am. J. Vet. Res., 1973, **34**, 11, 1405-1407.
13. WEBBER (A.J.), FIRKIN (B.G.). Two populations of platelets. Nature, 1965, **205**, 1332.
14. WRIGHT (J.H.). Changes in the adhesiveness of Blood Platelets following parturition and surgical operation. J. Path. Bact., 1942, **54**, 461.
15. ZAWILSKA (K.), IZRAEL (V.). Plaquettes et inflammation. Path. Biol., 1973, **21**, 7, 771-780.