

**VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n° 074

***DOSAGE DES FACTEURS DE COAGULATION VITAMINE K
DEPENDANTS CHEZ LE CHIEN : DEVELOPPEMENT,
VALIDATION ET INTERETS CLINIQUES.***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 30 octobre 2018
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

DA CUNHA Marjorie



**VETAGRO SUP
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n°074

***DOSAGE DES FACTEURS DE COAGULATION VITAMINE K
DEPENDANTS CHEZ LE CHIEN : DEVELOPPEMENT,
VALIDATION ET INTERETS CLINIQUES.***

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 30 octobre 2018
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

DA CUNHA Marjorie



Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (1er mars 2018)

Nom	Prénom	Département	Grade
ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORE	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIQUETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DEMONT	Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
JAUSSAUD	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
JEANNIN	Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
JOSSON-SCHRAMME	Anne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Contractuel
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothee	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
LEFEBVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Stagiaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MATEOS	Stevana	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
RIVES	Germain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGEANT	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS-CANCIAN	Aurélien	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothee	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur

Remerciements

A mon jury de thèse,

A Monsieur le Professeur François MION,

De la Faculté de médecine de Lyon, Claude Bernard Lyon 1,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, pour sa disponibilité,

Mes hommages respectueux.

A Madame le Docteur Emilie KRAFFT,

De VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon,

Pour m'avoir accompagnée tout au long de ce travail, pour sa disponibilité, ses conseils avisés, sa pédagogie, son organisation à toute épreuve, sa gentillesse et sa patience,

Mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Professeur Etienne BENOIT,

De VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de devenir mon second assesseur de thèse, pour son soutien, son sourire, ses bons mots, pour son sens du partage et de la transmission,

Mes remerciements les plus chaleureux.

A Madame la Professeure Virginie LATTARD,

De VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon,

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour avoir toujours été à mes côtés et à mon écoute, pour sa confiance, sa générosité et sa douceur,

Ma profonde gratitude.

Table des matières

Table des annexes	13
Table des figures	15
Table des tableaux	17
Liste des abréviations	19
Introduction	21
Partie I : Bibliographique	25
I. Physiologie de l'hémostase	25
A. L'hémostase primaire	25
1. Phase vasculaire	25
2. Phase plaquettaire	26
B. L'hémostase secondaire ou coagulation	27
1. Les facteurs de coagulation	27
a) Les facteurs de coagulation non vitamine K dépendants	28
i. Le facteur I	28
ii. Le facteur III	29
iii. Le facteur IV	29
iv. Le facteur V	30
v. Le facteur VI	30
vi. Le facteur VIII	30
vii. Le facteur XI	30
viii. Le facteur XII	31
ix. Le facteur XIII	31
b) Les facteurs de coagulation vitamine K dépendants	31
i. Le facteur II	32
ii. Le facteur VII	32
iii. Le facteur IX	33
iv. Le facteur X	33
2. Les autres acteurs de la coagulation	33
a) Les activateurs de la coagulation : phospholipides membranaires	33
b) Les inhibiteurs de la coagulation	33
i. L'antithrombine	34
ii. Système Protéine C-Protéine S-Thrombomoduline	34
3. Les étapes de la coagulation	34
a) La voie extrinsèque ou exogène ou tissulaire	35
b) La voie intrinsèque ou endogène ou sanguine de la coagulation	35
c) La voie commune de la coagulation	35

C.	L'hémostase tertiaire ou fibrinolyse	36
1.	Les acteurs de la fibrinolyse	36
a)	Le plasminogène et la plasmine	36
b)	Les Produits de Dégradation de la Fibrine (PDF)	37
c)	Les activateurs du plasminogène : l'activateur tissulaire du plasminogène et l'urokinase ..	37
d)	Les inhibiteurs du plasminogène : TAFI et PAI-1	37
e)	Les inhibiteurs de la plasmine	38
2.	Les étapes de la fibrinolyse	38
II.	Exploration de l'hémostase	39
A.	Exploration de l'hémostase primaire	39
1.	Le temps de saignement	39
a)	Temps de saignement chez l'homme	39
b)	Temps de saignement chez le chien	40
c)	Intérêts et limites	40
2.	La numération plaquettaire	41
3.	Autres tests d'exploration de l'hémostase primaire	41
B.	Exploration de l'hémostase secondaire	42
1.	Le temps de Quick (TQ)	42
2.	Le temps de Céphaline Activé (TCA)	42
3.	Le temps de Thrombine (TT)	43
4.	Concentration en fibrinogène.....	44
5.	Dosage des facteurs de coagulation	44
6.	Dosage de l'antithrombine III	45
7.	Dosage des « Protein Induced by Vitamin K Antagonism or Absence » (PIVKA)	45
C.	Exploration de la fibrinolyse	46
1.	Dosage des produits de dégradation de la fibrine (PDF)	46
2.	Dosage des D-Dimères	46
D.	Exploration globale de l'hémostase : thromboélastographie et thromboélastométrie	47
III.	Les troubles de l'hémostase secondaire en lien avec les facteurs de coagulation vitamine K dépendants	49
A.	Les troubles d'origine héréditaire	49
1.	Hémophilie B	49
a)	Symptomatologie et diagnostic	49
b)	Traitement	50
2.	Déficits d'origine génétique en facteur II, VII et X de la coagulation	51
a)	Déficit en facteur II de la coagulation	51
b)	Déficit en facteur VII de la coagulation	52

c)	Déficit en facteur X de la coagulation	53
3.	Déficit combiné en facteurs de coagulation vitamine K dépendants	53
B.	Les troubles d'origine acquise	54
1.	Les déficits en vitamine K : intoxication aux anti vitamine K (AVK) et hypovitaminose K	54
a)	Les intoxications aux AVK	54
b)	Les hypovitaminoses K	56
2.	Les maladies hépatiques	56
3.	Les CIVD	57
	Partie II : Expérimentale	59
I.	Objectifs	59
II.	Matériel et méthode	59
A.	Ethique, information aux propriétaires et gestion des données	59
1.	Comité d'éthique	59
2.	Informations aux propriétaires et gestion des données	60
B.	Matériel	60
1.	Populations étudiées	60
a)	Pour la validation des méthodes de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien : la population de chiens « Validation »	60
b)	Pour l'établissement des valeurs de référence des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien : les chiens « Ref »	60
i.	Nombre de sujets	60
ii.	Critères d'inclusion à l'étude	61
iii.	Critères d'exclusion de l'étude	61
c)	Pour une approche de l'intérêt clinique	61
i.	Les chiens « AVK »	62
ii.	Les chiens « Lepto » et « IRC »	62
2.	Déroulement des prélèvements pour les chiens « Ref » et traitement des échantillons sanguins	62
3.	Matériel de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants	63
C.	Méthode	63
1.	Principes de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien et méthodes de validation	63
i.	Principe du dosage du facteur II de la coagulation	64
ii.	Principe du dosage du facteur VII de la coagulation	64
iii.	Principe du dosage du facteur IX de la coagulation	65
iv.	Principe du dosage du facteur X de la coagulation	66
2.	Méthode de validation des dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien	66

3.	Etablissement des valeurs de référence chez le chien	67
4.	Approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien	68
III.	Résultats	68
A.	Validation des méthodes de dosage des facteurs vitamine K dépendant chez le chien	68
1.	Linéarité	68
i.	Résultats de linéarité pour le facteur II	68
ii.	Résultats de linéarité pour le facteur X	69
iii.	Résultats de linéarité pour le facteur VII	70
iv.	Résultats de linéarité pour le facteur IX	73
2.	Gammes d'étalonnage	74
3.	Reproductibilité	76
4.	Stabilité des facteurs au sein du plasma et effets des conditions de conservation	77
5.	Répétabilité	78
6.	Protocoles de dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants validés chez le chien	79
i.	Protocole de dosage du facteur II	79
ii.	Protocole de dosage du facteur VII	79
iii.	Protocole de dosage du facteur IX	81
iv.	Protocole de dosage du facteur X	82
B.	Etablissement des valeurs de référence chez le chien	83
1.	La population de chiens « Ref » étudiée	83
2.	Analyses statistiques des résultats de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants pour la population de chiens « Ref »	85
C.	Approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien	87
1.	Dosages des échantillons issus de la population chiens « AVK »	87
2.	Dosages des échantillons issus des populations chiens « Lepto » et « IRC »	88
IV.	Discussion	90
A.	Validation des méthodes de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien	90
B.	Etablissement de valeurs de référence des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien	92
C.	Approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants	93
D.	Elargissement de la discussion et perspectives de travail	93
	Conclusion	95
	Bibliographie	97
	Annexes	103

Table des annexes

<u>Annexe 1</u>	103
Comité d'éthique.....	103
<u>Annexe 2</u>	104
Lettre d'information aux propriétaires.....	104
<u>Annexe 3</u>	106
Consentement éclairé.	106
<u>Annexe 4</u>	107
Protocole de traitement des échantillons des chiens « Ref ».....	107
<u>Annexe 5</u>	108
Protocoles de dosage des facteurs II, VII, IX et X chez l'homme d'après Hyphen BioMed.	108

Table des figures

<u>Figure 1</u> : Schéma simplifié de la phase plaquettaire de l'hémostase primaire : 1- Adhésion plaquettaire ; 2- Activation plaquettaire ; 3- Agrégation plaquettaire.	27
<u>Figure 2</u> : Schéma de la formation de la fibrine à partir du fibrinogène, d'après (1).	29
<u>Figure 3</u> : Cycle de la vitamine K, d'après (2).	32
<u>Figure 4</u> : Schéma simplifié de la cascade de la coagulation plasmatique.	36
<u>Figure 5</u> : Schéma simplifié de la fibrinolyse.....	39
<u>Figure 6</u> : Schéma bilan des principaux temps de coagulation en fonction des voies de la cascade de coagulation sanguine, d'après (2).	43
<u>Figure 7</u> : Conversion des mouvements de l'axe du ROTEM® en tracé par détection optique, d'après (3).	47
<u>Figure 8</u> : Tracé théorique et paramètres obtenus par ROTEM®, d'après (3).	48
<u>Figure 9</u> : Mode d'action des AVK au sein du cycle de la vitamine K.	55
<u>Figure 10</u> : Schéma simplifié de la réaction de dosage du facteur II de la coagulation.	64
<u>Figure 11</u> : Schéma simplifié de la réaction de dosage du facteur VII de la coagulation.	65
<u>Figure 12</u> : Schéma simplifié de la réaction de dosage du facteur IX de la coagulation.	65
<u>Figure 13</u> : Schéma simplifié de la réaction de dosage du facteur X de la coagulation.....	66
<u>Figure 14</u> : Droite de régression linéaire à partir des résultats du dosage du facteur II en point final.	69
<u>Figure 15</u> : Droite de régression linéaire à partir des résultats du dosage du facteur X en point final.	70
<u>Figure 16</u> : <i>Graphique n°1</i> : droite de régression à partir des résultats du dosage du facteur VII en cinétique ; <i>Graphique n°2</i> : droite de régression après modification en variable logarithmique ; <i>Graphique n°3</i> : droite de régression en variable logarithmique après suppression de la dilution au 1/200.	71
<u>Figure 17</u> : <i>Graphique n°1</i> : droite de régression à partir des résultats du dosage du facteur VII en point final ; <i>Graphique n°2</i> : droite de régression après modification en variable logarithmique ; <i>Graphique n°3</i> : droite de régression en variable logarithmique après suppression de la dilution au 1/200.	72
<u>Figure 18</u> : <i>Graphique n°1</i> : droite de régression à partir des résultats du dosage du facteur IX en cinétique ; <i>Graphique n°2</i> : droite de régression après modification en variable logarithmique.	73
<u>Figure 19</u> : <i>Graphique n°1</i> : droite de régression à partir des résultats du dosage du facteur IX en point final ; <i>Graphique n°2</i> : droite de régression après modification en variable logarithmique.	74
<u>Figure 20</u> : <i>Graphique n°1</i> : courbe d'étalonnage du facteur II ; <i>Graphique n°2</i> : courbe d'étalonnage du facteur VII ; <i>Graphique n°3</i> : courbe d'étalonnage du facteur IX ; <i>Graphique n°4</i> : courbe d'étalonnage du facteur X.	75
<u>Figure 21</u> : Répartition de la population des chiens « Ref » en fonction du sexe.	83
<u>Figure 22</u> : Répartition des individus stérilisés ou entiers, en fonction du sexe ; FE = Femelles Entières, FS = Femelles stérilisées, ME = Mâles Entiers, MC = Mâles Castrés.....	83

<u>Figure 23</u> : Répartition de la population des chiens « Ref » en fonction de l'âge.	84
<u>Figure 24</u> : Répartition de la population des chiens « Ref » en fonction du poids.....	84
<u>Figure 25</u> : Distribution des valeurs de dosage des facteurs II, VII, IX, et X de la population « Ref ».	85
<u>Figure 26</u> : Distribution des valeurs de dosage des facteurs II, VII, IX, et X de la population de référence « Ref » en fonction du sexe.	86
<u>Figure 27</u> : Distribution des valeurs de dosage obtenus pour les facteurs II, VII, IX et X à partir des échantillons issus de la population de chiens intoxiqués « AVK ».....	87
<u>Figure 28</u> : Comparaison des distributions des valeurs de dosage des facteurs II, VII, IX, et X de la population des chiens « Ref » et de la population des chiens intoxiqués « AVK ».....	87
<u>Figure 29</u> : Comparaison des distributions des valeurs de dosage des facteurs VII et IX de la population des chiens « Ref » de référence et de la population des chiens « Lepto ».	88
<u>Figure 30</u> : Comparaison des distributions des valeurs de dosage des facteurs VII et IX de la population des chiens « Ref » de référence et de la population des chiens « IRC ».	89

Table des tableaux

<u>Tableau I</u> : Nomenclature des facteurs de coagulation.	28
<u>Tableau II</u> : Résultats des dosages de la gamme de dilution du facteur II en point final après 5min d'incubation, après adaptation du protocole humain Hyphen Biomed.....	68
<u>Figure 14</u> : Droite de régression linéaire à partir des résultats du dosage du facteur II en point final.	69
<u>Tableau III</u> : Résultats des dosages de la gamme de dilution du facteur X en point final après 4min d'incubation, après adaptation du protocole humain Hyphen Biophen.....	69
<u>Tableau IV</u> : Résultats des dosages de la gamme de dilution du facteur VII en cinétique après 9min d'incubation ; et en point final après 4min d'incubation après adaptation du protocole humain Hyphen Biomed.	70
<u>Tableau V</u> : Résultats des dosages de la gamme de dilution du facteur IX en cinétique après 2min d'incubation ; et en point final après 1min d'incubation, après adaptation du protocole humain Hyphen BioMed.....	73
<u>Tableau VI</u> : Reproductibilité des dosages de 5 échantillons de chiens « Validation », pour les facteurs II, VII et X.	76
<u>Tableau VII</u> : Stabilité des facteurs II, VII et X au sein du plasma citraté de chien après 1 ^{ère} décongélation puis conservation 5 jours entre 2 et 8 °C.	77
<u>Tableau VIII</u> : Stabilité du facteur VII au sein du plasma citraté de chien après un cycle de 1 ^{ère} décongélation-recongélation-2 ^{ème} décongélation.	78
<u>Tableau IX</u> : Résultats du test de répétabilité du dosage d'un échantillon de chien « Sains », pour le facteur X.	78
<u>Tableau X</u> : Protocole de préparation des réactifs utilisés lors du dosage du facteur II de la coagulation chez le chien.	79
<u>Tableau XI</u> : Mode opératoire du protocole de dosage en point d'arrêt du facteur II de la coagulation.....	79
<u>Tableau XII</u> : Protocole de préparation des réactifs utilisés lors du dosage du facteur VII de la coagulation chez le chien.	80
<u>Tableau XIII</u> : Mode opératoire du protocole de dosage en point d'arrêt du facteur VII de la coagulation.....	80
<u>Tableau XIV</u> : Protocole de préparation des réactifs utilisés lors du dosage du facteur IX de la coagulation chez le chien.	81
<u>Tableau XV</u> : Mode opératoire du protocole de dosage en point d'arrêt du facteur IX de la coagulation.....	81
<u>Tableau XVI</u> : Protocole de préparation des réactifs utilisés lors du dosage du facteur X de la coagulation chez le chien.	82
<u>Tableau XVII</u> : Mode opératoire du protocole de dosage en point d'arrêt du facteur X de la coagulation.....	82

Liste des abréviations

A

- AAV : Adeno-associés virus
- ADP : Adénosine Diphosphate
- ALAT : Alanine Aminotransférase
- AVK : Anti Vitamine K
- Ap-TEM : Aprotinine-Thromboélastométrie

C

- Ca²⁺ : Calcium
- CERREC : Centre d'Etude et de Recherche en Reproduction et Elevage Canin
- CHEVAC : Centre Hospitalier d'Enseignement Vétérinaire des Animaux de Compagnie
- CIVD : Coagulation Intra Vasculaire Disséminée

D

- DO : Densité Optique

E

- EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique
- ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- Ex-TEM : Extrinsèque-Thromboélastométrie

F

- [FVII-R2] : Complexe enzymatique FVII et thromboplastine calcique de lapin
- FIIIa : Facteur III activé
- FVa : Facteur V activé
- FVIIa : Facteur VII activé
- Facteur VII : Ca : Partie coagulante du complexe facteur VIII
- FVIIIa : Facteur VIII activé
- FIXa : Facteur IX activé
- FXIa : Facteur XI activé
- FXIIa : Facteur XII activé
- FXIIIa : Facteur XIII activé
- FXIII-A : sous unité A active du facteur XIII
- Fib-TEM : Fibrinolyse-Thromboélastométrie

G

- Gla : Acide aminé gamma-carboxyglutamate
- Glu : Acide glutamique
- Gplb : Glycoprotéine Ib
- GpIIbIIIa : Intégrine

H

-HGRP : Histidine Rich Glycoprotein

I

-ICBL : Institut Claude Bourgelat

-In-TEM : Intrinsèque-Thromboélastométrie

-IRC = Insuffisance Rénale Chronique

M

-MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

-min : Minute

-mL : Millilitre

N

-nm : Nanomètre

P

-PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur de la plasmine 1

-PAI-2 : Inhibiteur de l'activateur de la plasmine 2

-PAL : Phosphatases alcalines

-PDF : Produits de dégradation de la fibrine

-PDF-D / PDF-E : Fragments tardifs des produits de dégradation de la fibrine

-PDF-X / PDF-Y : Fragments précoces des produits de dégradation de la fibrine

-PIVKA : Protein Induced by Vitamin K Antagonism or Absence

-PIVKA-II : Décarboxyprothrombine

-PT1 : Venin de serpent *echis carinatus*

-PT2 : Substrat chromogénique spécifique de la thrombine

-PVKD : Protéines Vitamine K Dépendantes

R

-R1 : Facteur X humain ou Facteur X humain et Facteur VIII :C

-R2 : Thromboplastine calcique de lapin ou Thrombine, phospholipides, calcium et Facteur XI activé

-R3 : Substrat chromogène spécifique du facteur X activé

-R4 : Tampon Tris-BSA

-ROTEM : Rotative ThromboElastoMetrie

S

-SPM : Système des Phagocytes Mononuclés

-SXa-11 : Substrat spécifique du facteur X activé

T

-TAFI : Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor

-TCA : Temps de Céphaline Activée

-TEG : Thromboélastographie

-t-PA : Tissulaire Plasminogène Activator

-TQ : Temps de Quick

-TT : Temps de Thrombine

U

-U-PA : Urokinase Plasminogène Activator

V

-VKOR : Complexe Vitamine K épOxide Réductase

-VKORC1 : Complexe Vitamine K épOpxyde réductase sous-unité 1

-vWF : Facteur de von Willebrand

Introduction

Contrairement à ce qui est observé en médecine humaine, les méthodes d'investigation de l'hémostase en médecine vétérinaire des carnivores domestiques sont limitées, notamment en raison de connaissances biologiques plus restreintes de ce mécanisme dans ces espèces, et chez le chien notamment. En conséquence, les déficiences en vitamine K ne sont à l'heure actuelle diagnostiquées chez le chien que par l'intermédiaire du temps de prothrombine (autrement appelé temps de Quick). Or, il est établi qu'une diminution d'au moins 50 % de la prothrombine circulante est nécessaire pour que le temps de prothrombine soit prolongé. Ce test apparaît ainsi peu sensible pour le diagnostic d'une déficience en vitamine K chez le chien. D'autant qu'il est aussi peu spécifique, car pouvant être modifié dans d'autres contextes pathologiques.

Il en est de même pour les investigations des phénomènes d'hypercoagulabilité dans cette espèce. Actuellement, seuls les dosages des produits de dégradation de la fibrine et des D-dimères sont utilisés dans ce contexte mais ne permettent un diagnostic qu'après l'installation de la maladie. Aussi, il apparaît intéressant de développer des tests plus sensibles, plus spécifiques et avec une précocité diagnostique plus importante, pour une appréhension plus fine de l'hémostase chez le chien. Parmi ces tests on peut citer le dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants II, VII, IX et X. Leur dosage spécifique pourrait en effet avoir un rôle dans le diagnostic de coagulopathies d'origine héréditaire ; des états de déficience en vitamine K ou en γ -carboxylation ; ou encore des états d'hypercoagulabilité bien plus en amont que ce qui est réalisé aujourd'hui. D'autre part, le développement d'une méthode de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants peut aussi permettre d'évaluer le comportement de ces paramètres au sein d'une population de chiens sains, et ainsi déterminer des intervalles de référence qui pourraient ensuite avoir un intérêt pratique en clientèle ou dans le domaine de la recherche.

C'est donc dans cette optique que s'est déroulée cette étude expérimentale, qui a consisté à développer et valider une méthode de dosage des facteurs vitamine K dépendants, à établir des valeurs de référence chez le chien, et à effectuer une première approche de l'intérêt clinique de tels dosages dans cette espèce.

Une partie bibliographique exposera, dans un premier temps, un rappel sur la physiologie et les méthodes d'exploration de l'hémostase, ainsi qu'un point sur les coagulopathies d'origine héréditaires et acquises en lien avec les facteurs de coagulation vitamine K dépendants. Puis, dans un second temps, une partie expérimentale détaillera la méthodologie mise en place et les résultats obtenus au cours de cette étude.

Partie I : Bibliographique :

I. Physiologie de l'hémostase :

L'hémostase correspond à un ensemble de mécanismes physiologiques veillant à assurer l'intégrité du système vasculaire et la bonne circulation du sang en son sein. Ainsi, elle prévient les phénomènes thrombotiques et permet de réduire les risques hémorragiques par la réparation de possibles discontinuités de l'endothélium vasculaire.

Pour être efficace, l'hémostase doit être rapide mais circonscrite à la zone concernée par la brèche vasculaire, afin de maintenir de bonnes conditions de circulation sanguine. L'équilibre des mécanismes de l'hémostase s'appuie donc sur la thromborésistance des cellules endothéliales au repos permettant de prévenir l'activation de toute coagulation. Seule une rupture de l'intégrité de la couche endothéliale vasculaire, dévoilant les structures sous-endothéliales hautement thrombogènes et les mettant en contact avec le sang, pourra être à l'origine de l'activation de l'hémostase au niveau de la zone concernée par la lésion vasculaire.

L'hémostase se déroule alors en plusieurs étapes qui, physiologiquement, sont imbriquées et interdépendantes. Dans un premier temps, l'hémostase primaire, étape d'urgence du contrôle de l'hémorragie, aboutit à la formation du thrombus plaquettaire, fragile et temporaire. Puis, l'hémostase secondaire ou coagulation, vise à consolider le thrombus plaquettaire via un réseau de fibrine, aboutissant au thrombus fibrino-plaquettaire. Enfin, et secondairement à la réparation de la lésion vasculaire, l'hémostase tertiaire ou fibrinolyse, assure la dégradation du thrombus fibrino-plaquettaire. L'ensemble de ces processus est sous la dépendance d'un système de régulation précis et complexe, mettant en jeu des activateurs et des inhibiteurs des facteurs de l'hémostase. (4)

A. L'hémostase primaire :

L'hémostase primaire, première étape de l'hémostase, permet une obturation initiale de la brèche vasculaire. Elle se divise en deux phases, vasculaire puis plaquettaire, qui s'appuient sur quatre grands acteurs : les composants de la paroi vasculaire, les plaquettes, et deux protéines plasmatiques, le facteur de von Willebrand (vWF) et le fibrinogène ; à l'origine de la formation du thrombus plaquettaire ou thrombus blanc. (4),(5)

1. Phase vasculaire :

Immédiatement après l'apparition de la lésion vasculaire, une vasoconstriction passive liée à l'élasticité de la paroi du vaisseau sanguin se met en place. Elle est rapidement suivie par une vasoconstriction active résultant du réflexe des fibres musculaires lisses de la paroi vasculaire.

Cette vasoconstriction est ensuite entretenue via la synthèse de substances par les cellules endothéliales et les plaquettes activées lors de la phase plaquettaire (endothéline, sérotonine, thromboxane A₂, ...).

Le diamètre du vaisseau sanguin s'en voit alors diminué et le débit sanguin ralenti, ce qui a pour conséquence dans un premier temps de limiter les pertes sanguines et, dans un second temps, une stagnation au niveau de la lésion des éléments sanguins participant à l'hémostase.

Quant aux cellules endothéliales adjacentes à la brèche vasculaire, elles perdent leurs propriétés anti-thrombotiques pour devenir pro-thrombotiques en exposant des facteurs tissulaires à leur surface. (6)

La phase plaquettaire de l'hémostase primaire peut alors débuter. (4), (5)

2. Phase plaquettaire :

La phase plaquettaire de l'hémostase primaire se déroule en trois étapes : l'adhésion plaquettaire, l'activation plaquettaire et l'agrégation plaquettaire (figure 1).

Lors de l'étape d'adhésion plaquettaire, les plaquettes présentent dans le sang au niveau de la lésion vasculaire vont pouvoir adhérer de manière passive aux composants thrombogènes sous endothéliaux de la paroi vasculaire. Cette adhésion sera permise principalement par une glycoprotéine de surface plaquettaire, la GpIb, qui reconnaît le vWF qui se fixe lui-même au collagène sous-endothélial.

Cette adhésion des plaquettes permet leur activation et le recrutement de nouvelles plaquettes sur la zone lésionnelle. Les plaquettes activées discoïdes deviennent alors sphériques, émettent des pseudopodes et s'étalent à la surface de la zone de lésion vasculaire pour la recouvrir au mieux. Dans le même temps, les granules plaquettaires intracytoplasmiques sont concentrées puis sécrétées dans le plasma, ce qui est à l'origine de la libération de nombreux facteurs pro agrégants (fibrinogène, ADP, ...), pro coagulants (facteur V, vWF, ...) ou vasomoteurs (sérotonine, ...) favorisant le mécanisme de l'hémostase primaire. Une inversion de la polarité des membranes plaquettaires est aussi mise en place, permettant aux plaquettes de ne plus se repousser et facilitant par la suite le mécanisme de la coagulation sanguine.

Vient alors l'étape de l'agrégation plaquettaire, qui est permise par l'exposition à la surface des plaquettes d'un récepteur membranaire, l'intégrine (ou Gp α IIb β 3), et par une protéine plasmatique qui s'y fixe, le fibrinogène. Les plaquettes se lient alors les unes aux autres par des ponts inter-plaquettaires de fibrinogène.

L'ensemble de ces étapes aboutit à la formation du « clou plaquettaire » ou thrombus plaquettaire ou thrombus blanc, comblant la brèche vasculaire. (4), (7), (8), (2)

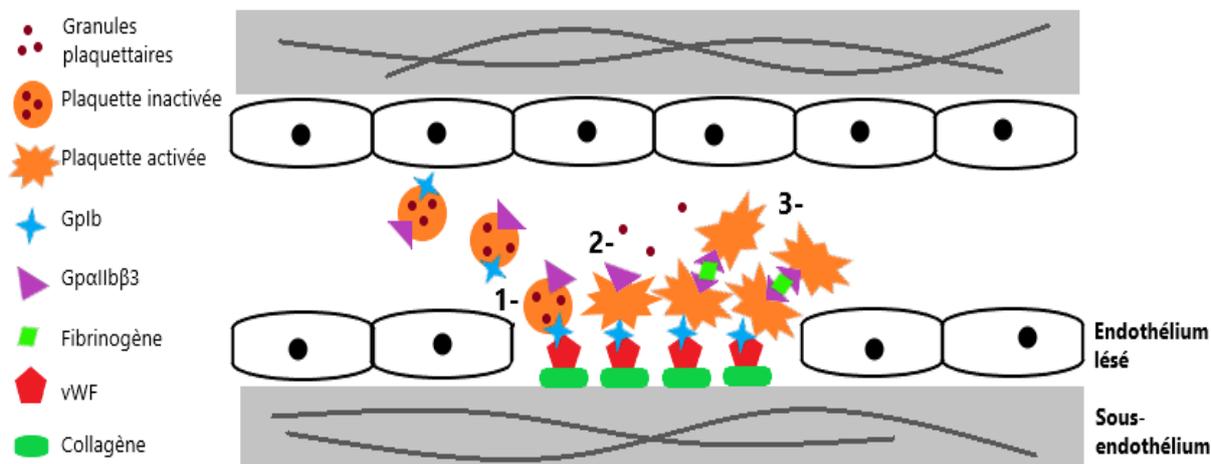


Figure 1 : Schéma simplifié de la phase plaquettaire de l'hémostase primaire : 1- Adhésion plaquettaire ; 2- Activation plaquettaire ; 3- Agrégation plaquettaire.

B. L'hémostase secondaire ou coagulation :

Bien que l'hémostase primaire permette de combler la brèche vasculaire par la formation du thrombus plaquettaire, ce dernier est fragile et temporaire. Il est donc indispensable que l'hémostase se poursuive par la coagulation, qui se base sur l'activation d'une cascade de réactions enzymatiques à laquelle participent des protéines plasmatiques nommées facteurs de coagulation. Ces derniers contribuent à la formation de thrombine et à la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. Ce mécanisme aboutit à la conversion du thrombus blanc en thrombus rouge, réalisant ainsi une hémostase plus solide et durable.

1. Les facteurs de coagulation :

Les facteurs de coagulation sont au nombre de treize et un numéro en chiffre romain leur a été attribué selon la nomenclature internationale (tab. I). Un facteur de coagulation activé est désigné par son numéro suivi du suffixe « a ».

On distingue trois catégories de facteurs de coagulation : les protéines à activité enzymatique (II, VII, IX, X, XI, XII) qui sont activées par protéolyse ; les protéines servant de cofacteurs (V, VIII) qui n'ont pas d'activité enzymatique propre mais qui catalysent la coagulation plasmatique en association avec le calcium (Ca^{2+}) et les phospholipides membranaires ; et les protéines ayant un rôle de substrat (fibrinogène).

À l'exception du facteur III tissulaire, tous les facteurs de la coagulation sont synthétisés au niveau du foie par les hépatocytes. Toute insuffisance hépatocellulaire sévère entraînera donc une diminution globale des facteurs de la coagulation par défaut de production.

La synthèse des facteurs II, VII, IX et X est sous la dépendance de la vitamine K. Le facteur VIII est aussi synthétisé par les cellules endothéliales. (5), (2)

On notera que les temps de demi-vie des facteurs de coagulation varient de quelques heures (facteur VII) à plusieurs jours (facteurs II et XIII) chez l'être humain (la moyenne étant estimée entre 1 et 2 jours). On considère souvent et potentiellement à tort que ces valeurs sont similaires chez les animaux domestiques. (2)

Tableau I : Nomenclature des facteurs de coagulation.

Numéro du facteur de coagulation	Nom du facteur de coagulation
Facteur I	Fibrinogène
Facteur II	Prothrombine
Facteur III	Facteur tissulaire ou thromboplastine
Facteur IV	Calcium ionisé
Facteur V	Proaccélérine
Facteur VI	Accélérine
Facteur VII	Proconvertine
Facteur VIII	Facteur anti hémophilique A
Facteur IX	Facteur anti hémophilique B
Facteur X	Facteur de Stuart-Prower
Facteur XI	Précurseur de la thromboplastine plasmatique
Facteur XII	Facteur de Hageman
Facteur XIII	Facteur de stabilisation de la fibrine

a) Les facteurs de coagulation non vitamine K dépendants :

i. Le facteur I :

Le facteur I ou fibrinogène, est une glycoprotéine synthétisée au niveau du parenchyme hépatique. Son temps de demi-vie est de l'ordre de 2 à 3 jours chez des chiens sains. (2)
Le fibrinogène est composé de deux sous-unités identiques, constituées chacune de trois chaînes polypeptidiques ($A\alpha$, $B\beta$ et γ) reliées entre elles par de nombreux ponts disulfures. L'ensemble donne à la molécule une forme de fibre, contenant trois globules : le domaine E central et les domaines D distaux. Le centre de cette protéine est constitué des fibrinopeptides A et B, riches en acides aminés négatifs tels que le glutamate ou l'aspartate, qui lui confèrent son caractère hydrosoluble et permettent la répulsion des molécules de fibrinogène entre elles.

Sous l'action de la thrombine, un clivage protéolytique libère les fibrinopeptides A et B du domaine E central. Se forment ainsi des monomères de fibrine qui polymérisent pour former une protofibrille, qui elle-même s'élargit pour constituer une fibre de fibrine. L'ensemble des liaisons faibles et ioniques mises en jeu lors de cette polymérisation sont finalement stabilisées sous forme de liaisons covalentes grâce à l'action du facteur XIIIa (figure 2). (9), (10), (11)

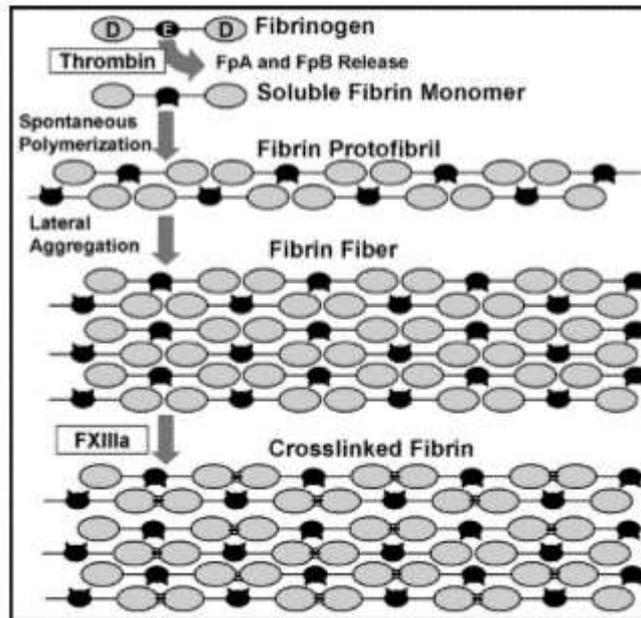


Figure 2 : Schéma de la formation de la fibrine à partir du fibrinogène, d'après (1).

ii. Le facteur III :

Le facteur III ou facteur tissulaire ou thromboplastine, est une protéine transmembranaire exprimée de manière constitutive par de nombreux tissus de l'organisme : poumons, cerveau, capsules des reins ou de la rate, adventice ou média des vaisseaux sanguins par exemple. Le facteur tissulaire est néanmoins toujours absent de la circulation sanguine en conditions physiologiques. Toutefois, les monocytes et les cellules endothéliales sont capables d'en produire en réponse à tout facteur stimulant, et notamment face à l'apparition d'une brèche vasculaire.

Le facteur tissulaire devient alors le principal déclencheur de la voie extrinsèque de la coagulation en activant le facteur VII : en effet, sous l'effet d'un flux calcique, les dimères de facteur tissulaire présents à la surface des cellules sont libérés et subissent un changement de conformation qui leur permettent de s'associer au facteur VII et de l'activer.

Le facteur tissulaire est le seul facteur de la coagulation qui n'est ni activé ni inactivé par protéolyse. (12), (13)

iii. Le facteur IV :

Le facteur IV de la coagulation correspond au calcium. Il circule sous forme ionisé et participe à de nombreux processus physiologiques comme la contraction musculaire ou la synthèse osseuse. Il est indispensable dans la plupart des étapes de la coagulation en contribuant à l'activation d'un grand nombre d'autres facteurs de la coagulation. (14)

iv. Le facteur V :

Le facteur V ou proaccélélerine est une protéine présente principalement dans le plasma sous forme libre, mais aussi au sein des granules α des plaquettes. Il est synthétisé entre autres par le foie. La présence du facteur V dans les granules plaquettaires résulte de processus d'endocytoses du facteur V circulant dans le sang ainsi que d'une synthèse par les mégacaryocytes eux-mêmes. Son temps de demi-vie est de l'ordre de 0.5 à 1.5 jours. (2)

Le facteur V possède deux activités : une pro-coagulante en tant que cofacteur enzymatique du facteur X ; et une anticoagulante. La première est permise par son activation en facteur Va sous l'action du facteur Xa et de la thrombine. Le facteur Va participe alors au complexe prothrombinase : association des facteurs Va et Xa, de phospholipides et de calcium assurant l'activation de la prothrombine en thrombine. On notera que le facteur Va est inhibé par la protéine C activée.

L'activité anticoagulante du facteur V est quant à elle assurée par sa forme inactivée, qui stimule l'action inhibitrice de la protéine C sur l'activation du facteur VIII.

v. Le facteur VI :

Le facteur VI ou accélélerine correspond à la forme activée du facteur V, et donc à l'ancienne appellation du facteur Va.

vi. Le facteur VIII :

Le facteur VIII ou facteur anti-hémophilique A est une glycoprotéine synthétisée en quasi-totalité par le foie, mais que l'on retrouve aussi dans d'autres organes comme les reins ou la rate. Le facteur VIII:C est la partie coagulante du complexe facteur VIII, il circule dans le plasma lié au vWF.

Le facteur VIII est activé sous l'action du facteur Xa ou de la thrombine pour donner le facteur VIIIa. Ce dernier constituera alors un cofacteur enzymatique du facteur IXa, de phospholipides et du calcium pour assurer l'activation du facteur X.

Un déficit congénital en facteur VIII aboutit à une hémophilie A, trouble héréditaire de la coagulation sanguine. (15)

vii. Le facteur XI :

Le facteur XI est une sérine protéase qui circule sous forme d'un zymogène dans le plasma. Il est synthétisé dans le foie. Il participe au sein de la coagulation à l'activation du facteur IX.

Le facteur XI est activé sous l'action de la thrombine, du facteur XIIIa ou de sa propre forme activée. Ainsi le facteur XI constitue un amplificateur de la cascade de coagulation.

Un déficit congénital en facteur XI est à l'origine de l'hémophilie C. (16)

viii. Le facteur XII :

Le facteur XII ou facteur de Hageman est une glycoprotéine, zymogène d'une sérine protéase et synthétisée par le foie. Il initie la voie endogène de la coagulation en s'activant au contact de surfaces chargées négativement, nombreuses au niveau de la média des vaisseaux sanguins. Il active ainsi le facteur XI en facteur XIa. (2)

ix. Le facteur XIII :

Le facteur XIII ou facteur de stabilisation de la fibrine est un zymogène d'une transglutaminase qui circule dans le plasma associé au fibrinogène, sous forme d'un hétérodimère constitué de deux sous-unités A et B.

Après clivage par la thrombine, il y a séparation des deux sous-unités du facteur XIII et la sous-unité A devient active (FXIII-A). Elle catalyse alors la formation de liaisons covalentes entre les dimères de fibrine, ce qui aboutit à une consolidation du caillot sanguin. (17), (2)

b) Les facteurs de coagulation vitamine K dépendants :

Les facteurs de coagulation vitamine K dépendants sont des protéines possédant au sein de leur séquence des domaines dits « Gla », dont la γ -carboxylation en présence de vitamine K est indispensable à leur liaison avec des ions calcium et des phospholipides anioniques membranaires et donc à leur participation au sein de la cascade de coagulation. (18)

La γ -carboxylation est une étape de maturation post-traductionnelle qui permet la transformation des résidus d'acide glutamique (GLU) du domaine « Gla » en résidus d'acide γ -carboxy-glutamique (GLA). Elle se déroule au sein du réticulum endoplasmique de l'hépatocyte. Quatre acteurs principaux sont nécessaires à sa réalisation : les proenzymes des facteurs de coagulation vitamine K dépendants ; deux enzymes situées sur la membrane du réticulum endoplasmique hépatocytaire : la γ -glutamyl-carboxylase vitamine K dépendante et le complexe vitamine K époxyde-réductase (VKOR) ; et la vitamine K sous sa forme réduite encore appelée hydroquinone.

Ainsi, la forme quinone non réduite de la vitamine K, provenant de l'alimentation et de la production par les bactéries intestinales essentiellement, passe la barrière intestinale, rejoint les hépatocytes, où elle est réduite sous sa forme active hydroquinone au niveau du réticulum endoplasmique. Elle devient alors un co-facteur pour la γ -glutamyl-carboxylase, qui déclenche la γ -carboxylation des facteurs de coagulation vitamine K dépendants. La vitamine K époxyde qui en résulte est ensuite recyclée en forme quinone sous l'action d'une sous unité du complexe vitamine K époxyde-réductase nommée VCORC1 (figure 3). (2), (19)

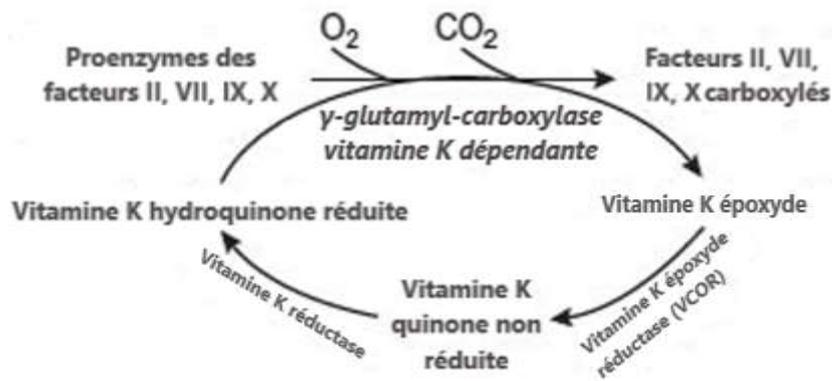


Figure 3 : Cycle de la vitamine K, d'après (2).

En l'absence de vitamine K, la réaction de γ -carboxylation ne peut pas avoir lieu, et les facteurs de coagulation vitamine K dépendants sont alors synthétisés sans modification de leur domaine « Gla ». Or c'est *via* les GLA γ -carboxylés, chargés négativement contrairement aux GLU non modifiés, qu'une liaison est permise avec les ions Ca^{2+} puis avec les phospholipides membranaires au cours de l'hémostase secondaire. Sans vitamine K et donc sans γ -carboxylation, les facteurs vitamine K dépendants ne peuvent pas assurer leur rôle au sein de la cascade de coagulation.

On notera que c'est essentiellement la vitamine K1, sous sa forme hydroquinone, qui est utilisée dans l'activation des facteurs de coagulation vitamine K dépendants. (18) (19)

i. Le facteur II :

Le facteur II de la coagulation ou prothrombine est une protéine plasmatique précurseur de la thrombine. Il est synthétisé par les hépatocytes en présence de vitamine K.

L'initiateur de la conversion de la prothrombine en thrombine est le complexe prothrombinase. Il est composé du facteur Xa qui catalyse le clivage de la prothrombine en deux chaînes ; du facteur Va, de phospholipides et de calcium, qui accélèrent la réaction et augmentent l'affinité du facteur Xa pour la prothrombine.

La thrombine est formée de deux chaînes (légère et lourde) issues du clivage de la prothrombine par le complexe prothrombinase. Elle possède une action à la fois pro-coagulante et anticoagulante. Elle permet l'activation respectivement des facteurs V, VIII, XI et XIII de la coagulation et des plaquettes, et en se liant à la thrombomoduline, de la protéine C inhibitrice de la coagulation. (20)

ii. Le facteur VII :

Le facteur VII ou proconvertine est une glycoprotéine synthétisée par les hépatocytes en présence de vitamine K.

Le facteur VII est activé sous l'action du facteur tissulaire (ou facteur III), en présence de calcium. Il peut aussi être activé par les facteurs IXa, Xa et XIIa. Lorsqu'il est complexé au facteur III, il assure à la fois son auto-activation et l'activation du facteur X au sein de la voie extrinsèque de la coagulation.

iii. Le facteur IX :

Le facteur IX ou facteur anti-hémophilique B est une protéine synthétisée par les hépatocytes suite à une modification post-traductionnelle vitamine K dépendante du domaine GLA. Son activation résulte de l'action du facteur XIa. Il peut également être activé par les facteurs VIIa ou Xa. Ainsi, il rentre en compétition avec le facteur X pour le site actif du facteur VIIa.

Un déficit congénital en facteur IX aboutit à une hémophilie B, trouble héréditaire de la coagulation sanguine.

iv. Le facteur X :

Le facteur X ou facteur Stuart-Prower, est une sérine protéase dont la synthèse hépatique est vitamine K dépendante. Son activation lors du mécanisme d'hémostase secondaire constitue la première phase de la voie commune de la coagulation.

Le facteur X peut être activé par le complexe facteur VIIIa-facteur IXa provenant de la voie intrinsèque de la coagulation ; ou par le complexe facteur IIIa-facteur VIIa de la voie extrinsèque de la coagulation. Une fois activé, le facteur Xa peut former avec le facteur Va, des phospholipides et du calcium, le complexe prothrombinase.

2. Les autres acteurs de la coagulation :

a) Les activateurs de la coagulation : phospholipides membranaires :

Les phospholipides membranaires constituent un support de fixation pour les facteurs de coagulation et participent ainsi à catalyser leur activation. Dans des conditions pathologiques (brèche vasculaire), ils sont en effet exposés aux facteurs de coagulation, leurs substrats et co-facteurs ; ils conditionnent ainsi le bon déroulement de la coagulation plasmatique. Ces phospholipides membranaires, en permettant la fixation de l'ensemble des acteurs de la coagulation plasmatique, la déclenchent et l'accélèrent considérablement.

Parmi ces phospholipides membranaires, on distingue le facteur tissulaire ou thromboplastine et le facteur plaquettaire 3 ou phosphatidylsérine.

Le facteur tissulaire, déjà décrit précédemment, est le déclencheur principal de la coagulation. La phosphatidylsérine est exprimée à la surface des plaquettes activées. (5), (21)

b) Les inhibiteurs de la coagulation :

La coagulation plasmatique est soumise à un système de régulation, qui est dispensable pour limiter le phénomène de fibrinof ormation à la brèche vasculaire. Sans intervention de molécules inhibitrices, en raison des propriétés auto-catalysantes des facteurs de coagulation, leur activation se ferait de proche en proche, aboutissant à l'extension de la formation des caillots sanguins.

Ainsi, en plus de la dilution par le flux sanguin des facteurs de coagulation activés, on voit intervenir au sein de ce système de régulation des facteurs anticoagulants : l'antithrombine et le système protéine C-protéine S-thrombomoduline. (5)

i. L'antithrombine :

L'antithrombine est le principal facteur anticoagulant. C'est une glycoprotéine synthétisée par le foie. Elle agit principalement en inhibant la thrombine ou facteur IIa, mais a aussi une action sur de nombreux autres facteurs activés (FVIIa, FIXa, FXa, FXIa).

Elle agit à distance du site de formation du caillot, permettant ainsi l'inactivation de facteurs activés circulants. Son activité est considérablement augmentée en présence de son co-facteur, l'héparine. (5), (2), (21), (22)

ii. Système Protéine C-Protéine S-Thrombomoduline :

La protéine C et la protéine S sont des protéines vitamine K dépendantes.

La protéine C circule dans le sang sous forme inactive. Lors d'un phénomène de coagulation, elle peut être activée par la thrombine. Il faut en revanche pour cela que la thrombine soit fixée à un récepteur, la thrombomoduline. Ainsi activée et en présence de protéine S, la protéine C devient un inhibiteur puissant des facteurs Va et VIIIa de la coagulation, ralentissant alors considérablement le renouvellement de la thrombine. (5), (2), (22), (21)

3. Les étapes de la coagulation :

On rappelle que l'objectif de la coagulation est d'aboutir à la formation de fibrine insoluble à partir du fibrinogène soluble présent au sein du caillot primaire, et ce afin d'obtenir un caillot secondaire plus solide et durable.

Or la transformation du fibrinogène en fibrine est possible uniquement en présence de thrombine. La synthèse de cette dernière dépend elle-même de la mise en jeu de la cascade enzymatique de la coagulation plasmatique, mécanisme complexe se déroulant en trois étapes : la voie extrinsèque (ou exogène ou tissulaire), la voie intrinsèque (ou endogène ou sanguine), et la voie commune de la coagulation (figure 4).

On notera que les deux premières voies sont complémentaires : physiologiquement il ne peut y avoir coagulation en l'absence de l'une d'entre elles. Il existe d'ailleurs des voies transversales d'activation les reliant l'une à l'autre. Leur objectif commun est d'aboutir à la formation du facteur X activé, initiateur de la voie commune de la coagulation.

On rappelle de plus que la coagulation a lieu in vivo de manière interdépendante avec l'hémostase primaire. (22)

a) La voie extrinsèque ou exogène ou tissulaire :

La voie extrinsèque est une voie de la coagulation qui, en plus des facteurs plasmatiques, met en jeu un facteur tissulaire, le facteur III. C'est une voie rapidement initiée, comportant peu de facteurs mais limitée dans le temps en raison de l'épuisement du facteur tissulaire.

La voie exogène débute lorsqu'en présence d'une brèche vasculaire, le facteur tissulaire présent à la surface des cellules sous-endothéliales, des fibroblastes et des fibres musculaires lisses vasculaires, rentre en contact avec le sang circulant. Récepteur membranaire ayant une forte affinité pour le facteur VII, le facteur tissulaire active ce dernier et permet la formation d'un complexe FVIIa-FIIIa. Et, si le facteur tissulaire est présent en quantité suffisante, le complexe FVIIa-FIIIa associé à du calcium, peut alors directement activer le facteur X.

En revanche, si la quantité de facteur tissulaire est limitée, le complexe FVIIa-FIIIa déclenche l'activation du facteur IX au sein de la voie endogène de la coagulation. L'accumulation de facteur IXa, associé à la présence du facteur VIIIa ainsi que de phospholipides et de calcium, permet secondairement l'activation du facteur X.

Une fois activé, le facteur Xa active en retour le facteur VII, amplifiant ainsi la réaction. (2), (21)

b) La voie intrinsèque ou endogène ou sanguine de la coagulation :

Cette voie de la coagulation ne fait intervenir que des facteurs plasmatiques. Elle est lente à se mettre en place mais l'action des facteurs qui y sont activés est durable au sein de la cascade de coagulation.

La voie intrinsèque débute avec l'activation du facteur XII suite à sa mise en contact avec les surfaces sous-endothéliales chargées négativement, et mises à nu au niveau de la brèche vasculaire. S'en suit l'activation du facteur XI puis du facteur IX. Ce dernier, en présence du facteur VIII activé, de calcium et de phospholipides membranaires, assure l'activation du facteur X de la voie commune de la coagulation. (2), (21)

c) La voie commune de la coagulation :

Le facteur X activé est l'initiateur de la voie commune de la coagulation. Suite à sa production par les voies extrinsèque et intrinsèque, il s'associe au facteur V activé, au calcium et aux phospholipides membranaires pour former le complexe prothrombinase.

Ce complexe est à l'origine de la thrombinoformation : il permet l'activation de la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur II activé). La thrombine est capable à son tour d'activer les facteurs V et VIII, amplifiant ainsi le rendement de la cascade de coagulation.

La thrombine est d'autre part à l'origine de la transformation du fibrinogène en fibrine. Enfin, elle active aussi le facteur XIII. Ce dernier, une fois activé, permet une stabilisation du caillot de fibrine en assurant la formation de liaisons covalentes entre les brins de fibrine, qui polymérisent et deviennent insolubles. Le thrombus rouge, solide et permanent est alors formé (figure 4). (5), (2)

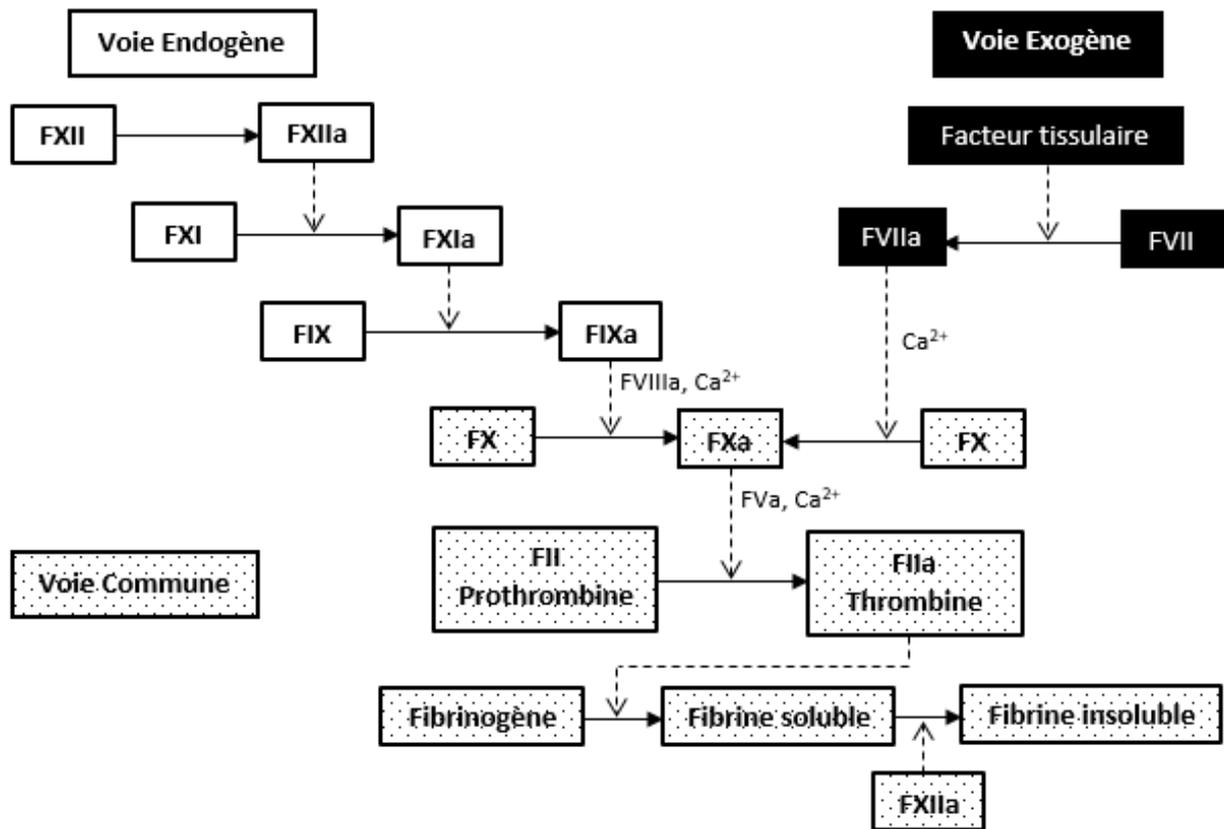


Figure 4 : Schéma simplifié de la cascade de la coagulation plasmatique.

C. L'hémostase tertiaire ou fibrinolyse :

La fibrinolyse est un processus physiologique à l'origine de la dissolution du caillot de fibrine insoluble. Cette étape de l'hémostase vise à limiter l'existence et l'extension du caillot formé et à assurer la reperméabilisation du vaisseau sanguin. (22) Elle s'appuie principalement sur l'action d'une enzyme protéolytique : la plasmine.

La fibrinolyse a lieu en moyenne entre 60 heures et 72 heures après la formation du thrombus rouge. Elle se déroule en suivant un schéma similaire à la cascade de coagulation, c'est-à-dire en mettant en jeu des enzymes et des facteurs qui s'activent ou s'inactivent mutuellement. (5)

1. Les acteurs de la fibrinolyse :

a) Le plasminogène et la plasmine :

Le plasminogène est une β -globuline synthétisée par le foie et précurseur inactif dans la circulation sanguine de la plasmine. L'activation du plasminogène est réalisée sous l'action de deux principaux activateurs : l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et l'urokinase (U-PA).

Le plasminogène a une forte affinité pour la lysine présente au niveau des fibres de fibrinogène et de fibrine. Il s'incorpore donc à ces fibres au cours de la formation du caillot sanguin.

Lors de la fibrinolyse, sous l'action de ses activateurs, le plasminogène est clivé pour former de la plasmine, enzyme protéolytique puissante capable d'hydrolyser la fibrine. Une faible quantité de plasminogène peut aussi être activée sous l'action des facteurs IIa, XIa et XIIIa de la coagulation. La plasmine formée dégrade la fibrine insoluble du caillot sanguin en formant des PDF (Produits de Dégradation de la Fibrine). Elle peut de plus dégrader le fibrinogène, les facteurs Va, VIIIa et XIIIa de la coagulation, et le vWF. (2)

b) Les Produits de Dégradation de la Fibrine (PDF) :

Les PDF résultent majoritairement de la dégradation de la fibrine par la plasmine. Toutefois ils ne sont pas spécifiques de cette dernière car ils peuvent aussi résulter de la dégradation du fibrinogène. (23)

Ils correspondent à différents fragments : un premier clivage de la fibrine par la plasmine aboutit en effet à un fragment PDF-X, lui-même à nouveau cliver en deux fragments asymétriques PDF-Y et PDF-D ; PDF-Y est ensuite clivé en fragments PDF-D et PDF-E. (2) On distingue ainsi des fragments dits précoces (PDF-X et PDF-Y) et des fragments dits tardifs (PDF-D et PDF-E).

Les PDF sont quantifiables dans le plasma et témoignent ainsi de l'activité de la plasmine et donc, indirectement, de l'activation de la fibrinolyse. Ce sont des produits qui vont être éliminés par voie hépatique, rénale et par le système des phagocytes mononucléés (SPM). (5), (2)

c) Les activateurs du plasminogène : l'activateur tissulaire du plasminogène et l'urokinase :

Le t-PA est synthétisé quasi exclusivement par les cellules endothéliales au cours de phénomènes d'agression. Il est ainsi libéré au niveau du site de formation du caillot sanguin. On notera qu'il peut également être synthétisé par les cellules mésothéliales, les monocytes et les macrophages. Le t-PA est lié à 80 % à l'inhibiteur de l'activateur de la plasmine 1 (PAI-1). Plus il sera en contact avec de la fibrine, plus il sera actif et efficace pour le clivage du plasminogène en plasmine.

L'U-PA, synthétisée par les cellules tubulaires rénales, est présente initialement sous la forme d'une pro-urokinase inactive dans le sang. Au contact du caillot sanguin en formation, la pro-urokinase s'active pour devenir l'urokinase, puissante activatrice du plasminogène.

On notera qu'il existe d'autres activateurs du plasminogène : le facteur XIIa, la kallikréine et la bradykinine, qui agissent essentiellement via l'activation du t-PA et de l'U-PA. (21)

d) Les inhibiteurs du plasminogène : TAFI et PAI-1 :

Le TAFI, ou Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor, est un zymogène plasmatique synthétisé par le foie. Il est aussi nommé carboxypeptidase U. Le TAFI possède un rôle anti fibrinolytique : il est en effet capable, après son activation en présence du complexe thrombine-thrombomoduline, de cliver la partie C-terminale de la fibrine, rendant ainsi impossible la fixation du plasminogène.

L'activateur du TAFI correspond au complexe thrombine-thrombomoduline : un taux élevé de thrombine est nécessaire à cette activation ; la thrombomoduline, quant à elle, stimule la réaction. La protéine C activée constitue un inhibiteur de l'activité du TAFI. (24)

Le PAI-1 ou Plasminogen Activator Inhibitor 1, est l'inhibiteur principal des activateurs du plasminogène. Il correspond à une glycoprotéine synthétisée principalement par les cellules endothéliales. Il inhibe l'activation du t-PA et de l'U-PA via des liaisons covalentes. Le processus physiologique de fibrinolyse ne peut donc pas avoir lieu. (5)

On notera qu'il existe d'autres inhibiteurs du plasminogène : le PAI-2, autre inhibiteur des activateurs du plasminogène (urokinase surtout), est présent chez la femme enceinte au niveau du placenta ; la lipoprotéine a, l'HGRP (Histidine Rich GlycoProtéin) et la thrombospondine entrent en compétition avec la lysine des fibres de fibrine et empêchent ainsi la fixation du plasminogène. (5)

e) Les inhibiteurs de la plasmine :

L' α -2-antiplasmine est le principal inhibiteur de la plasmine. C'est une glycoprotéine synthétisée par le foie, capable de se fixer à la plasmine libre circulante et d'inhiber ainsi son activité fibrinolytique. (5)

L' α -2-macroglobuline, l' α -1-antitrypsine et l'inhibiteur de la C1 estérase sont d'autres inhibiteurs importants de la plasmine.

2. Les étapes de la fibrinolyse :

En l'absence de fibrine, le plasminogène est présent sous sa forme inactive dans la circulation sanguine, tout comme la pro-urokinase et le t-PA qui est fixé à son inhibiteur le PAI-1.

Lors de la formation d'un caillot, et donc en présence de fibrinogène et surtout de fibrine, le plasminogène s'incorpore aux fibres de fibrine du fait de sa forte affinité pour la lysine ; le t-PA est libéré par les cellules endothéliales et s'active au contact de la fibrine, tout comme la pro-urokinase qui donne l'urokinase. Sous l'action de ses activateurs, dont l'activité est favorisée par le facteur XIIa, la bradykinine et la kallibréine, le plasminogène est clivé pour former la plasmine. Cette dernière hydrolyse alors la fibrine aboutissant ainsi à la formation de fragments hétérogènes, les PDF, qui secondairement seront traités par voie hépatique et éliminés par voie rénale et par le SPM (figure 5).

Lorsque la plasmine est en excès, elle passe dans le courant circulatoire où elle est rapidement neutralisée par ses inhibiteurs, principalement l' α -2-antiplasmine et l' α -2-macroglobuline. Le phénomène de fibrinolyse reste ainsi localisé au niveau du caillot sanguin.

L'ensemble de ces étapes est finement régulé par l'intervention des inhibiteurs du plasminogène et de la plasmine précédemment cités. (2)

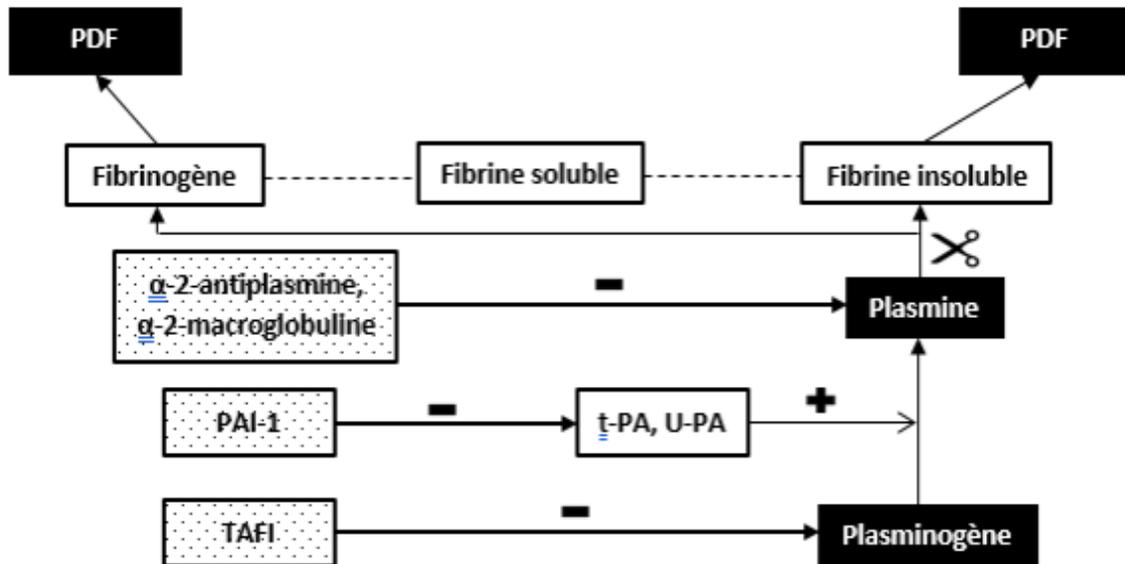


Figure 5 : Schéma simplifié de la fibrinolyse.

II. Exploration de l'hémostase :

Au vu de la complexité du mécanisme de l'hémostase, il est nécessaire de s'appuyer sur plusieurs tests pour pouvoir l'explorer. On distingue ainsi les tests qui explorent l'hémostase primaire, la coagulation plasmatique, la fibrinolyse, et enfin les tests explorant l'hémostase dans sa globalité : la thromboélastographie et la thromboélastométrie.

A. Exploration de l'hémostase primaire :

1. Le temps de saignement :

Le temps de saignement est un test d'exploration global *in vivo* de l'hémostase primaire. Il consiste à mesurer le temps nécessaire à l'arrêt d'un saignement provoqué après incision superficielle de la peau du patient.

a) Temps de saignement chez l'homme :

En médecine humaine, trois méthodes sont décrites : la méthode de Duke datant de 1910 (incision au niveau du lobe de l'oreille), la méthode d'« Ivy trois points » mise en place 30 ans plus tard et la méthode d'« Ivy incision » variante de la précédente. Cette dernière est aujourd'hui la méthode de référence : une incision standardisée horizontale est réalisée sur la face antérieure de l'avant-bras du patient, sous le pli du coude, tandis qu'un garrot est positionné au niveau du bras ; un chronomètre est lancé en début de saignement ; l'écoulement du sang est ensuite absorbé toutes les 30 secondes à l'aide d'un papier buvard, jusqu'à l'arrêt du saignement, et ce sans jamais toucher la plaie.

En fonction de la méthode utilisée, les valeurs usuelles attendues chez l'homme sont les suivantes : 2 à 4 minutes pour le test de Duke, 2 à 5 minutes pour l'épreuve d'« Ivy trois points » et 4 à 8 minutes pour la technique d'« Ivy incision ». (25), (26)

b) Temps de saignement chez le chien :

Le temps de saignement utilisé en médecine vétérinaire est fortement inspiré des méthodes employées en médecine humaine.

Ainsi, chez le chien, on réalise communément une incision franche et horizontale d'un capillaire sanguin superficiel au niveau de la face interne du pavillon auriculaire, à l'aide d'une aiguille ou d'une lame ; le chronomètre est déclenché puis l'on absorbe à l'aide d'un papier buvard les gouttes de sang qui se forment jusqu'à l'arrêt du saignement, et ce sans jamais toucher la plaie. On peut aussi réaliser l'incision sur la truffe de l'animal, les lèvres ou la face plantaire des coussinets. Ces techniques rappellent l'épreuve de Duke utilisée en médecine humaine.

Il est aussi possible de réaliser chez le chien un temps de saignement gingival, inspiré de la méthode d'« Ivy incision » : l'animal est placé en décubitus latéral, un lien autour de la babine supérieure pour la retourner et permettre un meilleur engorgement sanguin de la muqueuse ; à l'aide d'un dispositif, deux incisions standardisées sont réalisées sur la gencive ; le chronomètre est déclenché et les gouttes de sang sont absorbées toutes les 5 secondes sans jamais toucher la plaie, et ce jusqu'à l'arrêt du saignement.

Chez le chien, un temps de saignement normal est en moyenne de 2 minutes. Il ne doit en tous les cas jamais dépasser 5 minutes. (27)

c) Intérêts et limites :

Le temps de saignement est un test d'exploration de l'hémostase primaire qui renseigne sur la fonction hémostatique des plaquettes et des vaisseaux sanguins.

Historiquement, ce test a été développé pour évaluer le risque hémorragique opératoire et pour rechercher/confirmer l'existence d'un syndrome hémorragique.

Une augmentation du temps de saignement attesterait donc d'anomalies telles qu'une thrombopénie, une thrombopathie, une maladie de von Willebrand, une afibrinogénémie, ou encore des anomalies vasculaires.

Ce test d'exploration de l'hémostase primaire présente toutefois un certain nombre de limites. Tout d'abord il est très opérateur dépendant et ainsi peu reproductible. D'autre part il est très peu sensible et spécifique : il est donc notamment peu utile à l'établissement d'un diagnostic précis d'un syndrome hémorragique.

Des erreurs par défaut ou par excès peuvent de plus fausser les résultats obtenus. Les erreurs par excès peuvent être la conséquence d'une incision trop profonde ou sur une zone trop vascularisée (congestion), ou de la réalisation du test sur un animal présentant une vasodilatation marquée secondaire à une agitation ou à des conditions de température non adaptées. Les erreurs par défauts peuvent résulter quant à elles d'une incision trop superficielle, ou de la réalisation du test sur un animal présentant une vasoconstriction secondaire par exemple à un état de stress augmenté.

C'est donc pour ces raisons qu'à l'heure actuelle le temps de saignement est très peu utilisé en médecine humaine ou vétérinaire. On le réserve actuellement à l'exploration d'un trouble de l'hémostase primaire pour lequel on a déjà exclu une thrombopénie. (22), (25), (26)

2. La numération plaquettaire :

La numération plaquettaire est un test indispensable pour l'exploration de l'hémostase primaire, effectué lors de l'hémogramme. Il se réalise en routine à partir de sang prélevé sur un tube EDTA (anticoagulant), et permet ainsi de compter le nombre de plaquettes circulantes. Ce comptage peut être réalisé manuellement, mais il est le plus souvent effectué à l'aide de compteurs automatiques. Ainsi, les résultats sont obtenus plus rapidement et sont plus reproductibles. L'intérêt de la numération plaquettaire est de mettre en évidence un excès de plaquettes ou thrombocytose ; un défaut de plaquettes ou thrombopénie. Les thrombopathies ne pourront pas quant à elles être révélées par ce test. Chez le chien, les valeurs normales attendues sont comprises entre 200 et 500 m/mm³.

Lors de mise en évidence d'une thrombopénie par l'automate, il faut toujours vérifier les résultats obtenus *via* un frottis sanguin. Il existe en effet des causes possibles d'erreur par défaut : pseudothrombopénie liée à la présence d'agrégats plaquettaires principalement. Ces derniers une fois formés sont comptés par l'automate comme une entité à part entière, ce qui est à l'origine d'une sous-estimation du nombre de plaquettes circulantes.

L'agrégation plaquettaire peut être EDTA dépendante ou EDTA indépendante. Lors d'agrégation plaquettaire EDTA dépendante, un récepteur plaquettaire Gp IIb/IIIa est activé ou démasqué en présence de l'anticoagulant contenu dans le tube de prélèvement. Et du fait de l'existence chez certains patients d'anticorps dirigés contre ce récepteur, le mécanisme d'agrégation se met en place. Les agrégats formés peuvent être de taille plus ou moins importante, minorant de manière proportionnelle le comptage des plaquettes circulantes. Afin d'éviter cette réaction, il est possible de réaliser un nouveau prélèvement sur tube citraté, bien que la formation d'agrégats plaquettaire soit toujours possible.

Dans le cas d'agrégations plaquettaires non EDTA dépendante, c'est souvent la qualité de la prise de sang qui rentre en jeu. Si plusieurs répétitions ont été nécessaires pour réaliser le prélèvement de sang, le mécanisme de l'hémostase a pu être amorcé, entraînant la formation du clou plaquettaire et donc une diminution du nombre de plaquettes circulantes.

La réalisation d'un frottis sanguin est donc indispensable pour objectiver la réelle ou pseudo thrombopénie et ainsi adapter les décisions cliniques futures. (28), (29)

3. Autres tests d'exploration de l'hémostase primaire :

En complément et en fonction des résultats du temps de saignement et de la numération plaquettaire, d'autres tests peuvent être utilisés pour explorer l'hémostase primaire : le myélogramme réalisé en cas de thrombopénie, qui consiste en une ponction de moelle osseuse afin de déterminer si l'on est face à une thrombopénie d'origine centrale ou périphérique ; les tests de fonction plaquettaire effectués face à une augmentation du temps de saignement sans modification de la numération plaquettaire, évaluant les capacités d'adhésion, d'agrégation et de sécrétion des plaquettes ; l'évaluation à la fois quantitative et qualitative du facteur de von Willebrand.

Toutefois, à l'exception du myélogramme, les tests cités précédemment sont encore peu réalisés en médecine vétérinaire.

B. Exploration de l'hémostase secondaire :

Les tests d'exploration de la coagulation sont réalisés à partir de sang prélevé sur tube citraté. Afin de ne pas fausser les résultats de ces tests, il est recommandé de réaliser une prise de sang de bonne qualité : franche, en une seule fois, sans hémolyse. De plus, il faut veiller à respecter la proportion sang / anticoagulant. (2)

Parmi les tests d'exploration de l'hémostase secondaire, on distingue des tests globaux qui sont les plus couramment utilisés : temps de quick, temps de céphaline activée, temps de thrombine ; et des tests de seconde intention réalisés en fonction des résultats obtenus lors des tests globaux : dosage du fibrinogène, dosage des facteurs de coagulation, dosage de l'antithrombine III et dosage des « Protein Induced by Vitamin K Antagonism or Absence » (PIVKA).

1. Le temps de Quick (TQ) :

Le temps de Quick est un test d'exploration de la voie exogène et de la voie commune de l'hémostase secondaire. Ainsi, il permet d'évaluer les facteurs de la coagulation I, II, V, VII et X. Le TQ consiste à mesurer le temps de formation d'un caillot après avoir mis en présence le plasma du patient avec du facteur tissulaire (thromboplastine) en excès et du calcium, déclencheurs de la voie tissulaire de la coagulation. (2), (30)

Le TQ chez un chien sain est en moyenne de 10 secondes, les valeurs physiologiques sont toutefois assez variables d'un chien à l'autre. Il n'y a pas de valeurs usuelles à proprement dites, notamment en raison des variations possibles des résultats en fonction du type de thromboplastine utilisée. (2) Ainsi il est courant de réaliser un prélèvement sanguin dans les mêmes conditions que citées précédemment chez un chien ou un groupe de chiens témoins sains, afin de comparer les résultats obtenus chez l'animal testé à ceux du ou des témoins. On parle alors de taux de prothrombine et on considère qu'une augmentation de plus de 25 % chez le patient par rapport aux résultats du chien ou des chiens témoins est anormale. (2)

La mesure du TQ est le test à privilégier dans le cas d'une suspicion d'intoxication aux anticoagulants. Le facteur VII étant le facteur de coagulation vitamine K dépendant à la durée de demi-vie la plus courte, c'est le TQ qui est le premier modifié (augmenté) dans ce contexte. (30) De nombreuses causes peuvent entraîner une augmentation du TQ : intoxication aux anti vitamine K, insuffisance hépatique, CIVD (Coagulation Intra Vasculaire Disséminée), déficit en facteur VII (rare chez le chien), ... (31) On notera qu'un plasma lipémique ou ictérique pourra être à l'origine d'une diminution du TQ chez le chien. (32)

2. Le temps de Céphaline Activé (TCA) :

Le temps de céphaline activé est un test d'exploration des voies endogène et commune de la coagulation plasmatique. Il permet ainsi d'évaluer l'ensemble des facteurs de la coagulation à l'exception des facteurs VII et XIII. (2), (30)

Le TCA consiste à mesurer le temps de formation d'un caillot après avoir mis en présence le plasma du patient avec du calcium, de la céphaline (substitut plaquettaire) et un activateur de la voie intrinsèque de la coagulation. (2) Lorsque cet activateur est de la kaolin, on parle alors de temps de céphaline kaolin activé.

En moyenne le TCA est compris entre 10 et 20 secondes chez un chien sain. (31) Mais de la même façon que pour le TQ, les valeurs usuelles sont variables d'un laboratoire à l'autre, et ce en fonction notamment de l'activateur de la phase de contact ou de l'automate utilisé. (4)

De nombreuses causes peuvent entraîner une augmentation du TCA : déficit congénital en facteurs VIII (hémophilie A) ou IX (hémophilie B) surtout, déficit en vWF, intoxication aux antivitaminé K, CIVD, ... On notera qu'une thrombopénie marquée peut entraîner un allongement du TCA en raison de la diminution de phospholipides disponibles, et ce alors même qu'il n'y a pas d'anomalie au sein de la cascade de coagulation plasmatique. (2), (30)

On notera de plus qu'un plasma fortement hémolysé, lipémique ou ictérique peut entraîner une diminution du TCA. (32)

3. Le temps de Thrombine (TT) :

Le temps de thrombine est un test d'exploration de la dernière étape de la voie commune de la coagulation. Il permet ainsi d'évaluer l'efficacité de la conversion du fibrinogène en fibrine sous l'action de la thrombine.

Le TT consiste à mesurer le temps nécessaire à la formation du caillot de fibrine après avoir mis en présence le plasma du patient avec de la thrombine. Il est donc inversement proportionnel à la quantité de fibrinogène. (31) À l'image des TQ et TCA, l'interprétation des valeurs obtenues dépendra des valeurs usuelles établies par les différents laboratoires, en raison des différentes méthodes de mesure utilisées. (2)

Une augmentation du TT pourra s'expliquer par une hypofibrinogénémie ou afibrinogénémie, par la présence d'héparine dans l'échantillon, par une augmentation des PDF, par une hypoalbuminémie ou encore une amyloïdose. En revanche les anomalies des facteurs de coagulation n'auront aucune conséquence sur le TT.(2), (30)

On notera qu'un plasma lipémique ou hémolysé peut entraîner une diminution du TT. (32)

La répartition des principaux temps de coagulation utilisés dans l'exploration de l'hémostase secondaire en fonction de la voie de la cascade de coagulation à laquelle ils font partie, est résumé dans la figure 6.

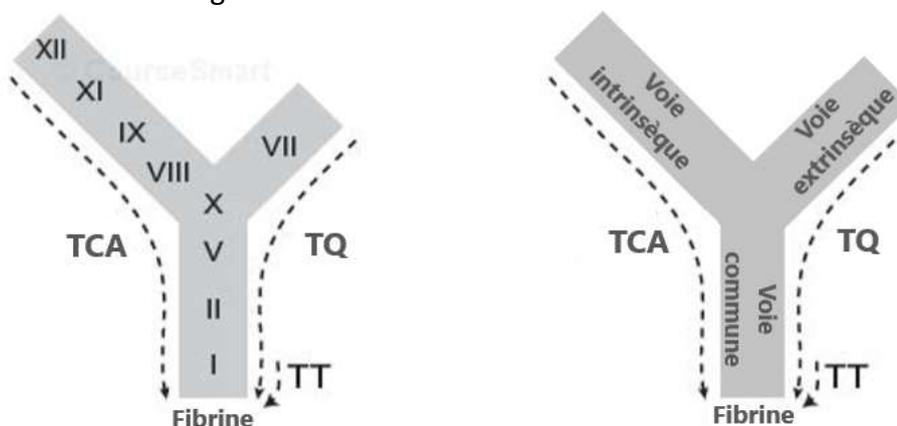


Figure 6 : Schéma bilan des principaux temps de coagulation en fonction des voies de la cascade de coagulation sanguine, d'après (2).

4. Concentration en fibrinogène :

La méthode de référence du dosage du fibrinogène est la méthode chromométrique de Von Clauss. Elle consiste à mettre en présence une forte concentration de thrombine avec le plasma à tester, ce dernier étant dilué dans un plasma dénué de fibrinogène de manière à ce que le fibrinogène devienne le facteur limitant de la réaction. La formation du caillot de fibrine étant inversement proportionnel à la quantité de fibrinogène disponible, le temps de coagulation du plasma reflète ainsi la concentration en fibrinogène plasmatique. (31)

L'utilisation d'une forte concentration de thrombine permet de limiter les effets inhibiteurs de la présence éventuelle d'héparine (2) ; la dilution du plasma à tester permet de limiter les interférences avec d'éventuels forts taux en PDF, notamment dans les cas de CIVD. Il a en effet été montré qu'une forte concentration en PDF dans le plasma pouvait entraîner une diminution des résultats obtenus avec la méthode de Von Clauss.(33)

5. Dosage des facteurs de coagulation :

Le dosage des facteurs de coagulation est réalisé en médecine vétérinaire lorsque les signes cliniques et les résultats des tests globaux de coagulation suggèrent l'existence d'une possible déficience en un facteur de coagulation. (2) Deux méthodes principales sont alors utilisées pour déterminer l'activité des facteurs de coagulation.

La première se base sur la capacité du plasma testé à corriger la prolongation du temps de coagulation d'un plasma déficitaire en un facteur connu de coagulation. (34)

Par exemple, dans le cas d'un plasma connu comme étant déficitaire en facteur VIII, avec un temps de coagulation augmenté, si la mise en présence avec le plasma testé ne permet pas une correction du temps de coagulation, on pourra affirmer que le plasma testé est lui aussi déficitaire en facteur VIII. On aura alors confirmé l'existence d'une hémophilie A chez le patient. Et inversement, si le temps de coagulation est corrigé suite à l'ajout du plasma testé, on pourra affirmer que le patient ne présente pas de déficience du facteur VIII et donc pas d'hémophilie A.

La seconde méthode se base sur la capacité des facteurs ou des pro-facteurs de coagulation à cliver des substrats chromogènes. (34) On met ainsi en présence le plasma à tester contenant le facteur à doser avec des réactifs et des facteurs de coagulation en excès, de manière à déclencher une cascade d'activation aboutissant au clivage du substrat chromogène spécifique d'un des facteurs activés. La densité optique obtenue en fin de réaction suite au clivage du substrat chromogène est alors proportionnelle à la concentration du facteur de coagulation déclencheur de la cascade d'activation. L'avantage de cette seconde méthode est qu'elle permet de s'affranchir des plasmas déficients en un facteur spécifique de coagulation.

Le dosage des facteurs de coagulation par les méthodes chromogéniques sont classiquement utilisées en médecine humaine. Elles offrent une précision de dosage plus importante. (31) Le dosage des facteurs VII, VIII, IX et X par les méthodes chromogéniques sont déjà validés en médecine équine, mais très peu de dosages le sont en médecine des carnivores domestiques. (34), (35)

Ainsi, c'est essentiellement la première méthode de dosage des facteurs de coagulation que l'on retrouve en médecine vétérinaire. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport aux résultats d'un plasma témoin normal testé dans les mêmes conditions que celle du plasma du patient. (31)

6. Dosage de l'antithrombine III :

Le dosage de l'antithrombine III s'appuie sur une méthode chromogénique. Le plasma à tester est mis en présence avec un réactif contenant en excès de la thrombine ou du facteur X activé ; du substrat chromogène spécifique de la thrombine ou du facteur Xa ; et de l'héparine. (2) La méthode utilisant le facteur Xa est souvent préférée à celle utilisant la thrombine, notamment parce que le facteur Xa présente une meilleure stabilité. (31)

Ainsi, le facteur Xa en excès réagit avec l'antithrombine III du plasma testé et avec l'héparine pour former un complexe facteur Xa-antithrombine III inactif. Le facteur Xa non complexé réagit alors avec son substrat chromogène spécifique et l'intensité de la couleur émise est mesurée par spectrophotométrie. Les résultats obtenus sont ensuite comparés à ceux d'un pool de plasmas spécifique de l'espèce testée ou de l'homme et exprimés en pourcentage d'activité par rapport au 100 % d'activité de ce pool de plasma de référence. (31)

Les valeurs usuelles varient donc en fonction de la méthode utilisée et de l'espèce choisie pour constituer le pool de plasmas de référence. (2)

7. Dosage des PIVKA :

Les PIVKA correspondent à des facteurs de coagulation vitamine K dépendants non γ -carboxylés produits par les hépatocytes en présence d'anti vitamine K, ou en cas d'absence ou de déficience de la vitamine K elle-même. Dans ces conditions, la γ -carboxylation ne peut en effet avoir lieu ou est incomplète. Il y a donc libération dans le sang de PIVKA dont la concentration augmente, tandis que la concentration en facteurs de coagulation vitamine K dépendants γ -carboxylés diminue. De sorte que, doser le taux de PIVKA circulant paraît intéressant pour mettre en évidence un contexte de déficit en vitamine K, ou encore d'intoxication aux anti vitamine K. Chez l'homme, le dosage des PIVKA, et en particulier de la décarboxyprothrombine (PIVKA-II), a également un intérêt diagnostique pour les carcinomes hépatocellulaires ou un intérêt pronostique et de surveillance pour les carcinomes hépatocellulaires récidivants. (36), (37), (38), (39) Ainsi, en médecine humaine, des méthodes de dosages radio-immunologique et immuno-enzymologique sont utilisées pour mesurer la concentration en PIVKA sanguins circulants, ce qui n'est pas le cas en médecine vétérinaire.

Chez le chien, il existe un test d'exploration des PIVKA : le thrombotest. Ce dernier correspond à un TQ modifié, qui est sensible à la présence de PIVKA dans le plasma. L'inconvénient de ce test, c'est qu'il n'est pas spécifique des PIVKA et donc ne permet pas de calculer directement leur concentration dans le plasma : le thrombotest permet de mesurer une diminution du taux de facteur II, VII et X dans le plasma quelle qu'en soit la cause (le facteur V et le fibrinogène ne sont pas dosés car ils sont apportés en excès durant le test). Dans le cas où des PIVKA sont présents dans le plasma testé, le temps du thrombotest sera simplement prolongé, car les PIVKA agissent comme des substrats compétitifs et ainsi retarde le temps de formation de la thrombine.

On ne pourra toutefois pas déterminer leur concentration exacte. (2), (40) D'autre part, une étude a montré que si, dans un contexte d'intoxication aux anti vitamine K, le TQ et le thrombotest étaient augmentés, il n'y avait pas de différence significative entre ces deux tests pour préférer l'un ou l'autre dans la démarche diagnostic d'une telle intoxication. En revanche leur augmentation simultanée, associée à une augmentation du TCA sans augmentation du TT, est fortement en faveur d'une intoxication aux anti vitamine K. (40)

C. Exploration de la fibrinolyse :

L'exploration de la fibrinolyse en médecine vétérinaire est essentiellement réalisée afin de détecter une augmentation du phénomène de fibrinolyse dans l'organisme. En médecine humaine, de nombreux dosages existent pour explorer la fibrinolyse : dosage du plasminogène, de l' α -2-antiplasmine, du t-PA et du PAI-1, des produits de dégradation de la fibrine, des D-Dimères. Mais leur utilisation est limitée en médecine vétérinaire du fait de leur coût.

Ainsi, l'exploration spécifique de la fibrinolyse en médecine vétérinaire se limite aux dosages des produits de dégradation de la fibrine et des D-Dimères, et ce majoritairement dans un contexte de suspicion de CIVD ou de thrombo-embolie. Les autres tests sont réservés au domaine de la recherche.

1. Dosage des produits de dégradation de la fibrine (PDF) :

Le dosage des PDF est réalisé à partir de sang prélevé sur tube citraté, en veillant toujours aux bonnes conditions de réalisation du prélèvement afin de limiter toute coagulation. (2)

Le plasma à tester est mis en présence avec des billes de latex sur lesquelles sont adsorbés des anticorps monoclonaux anti PDF. Ainsi, si des PDF sont présents dans le plasma testé, un phénomène d'agglutination des billes de latex se met en place. La réalisation du dosage sur différentes dilutions du plasma à tester permet d'estimer de manière semi-quantitative la concentration de PDF présents. Les résultats obtenus sont exprimés en $\mu\text{g/mL}$, en ng/mL ou en $\mu\text{g/L}$. (31)

Les PDF n'étant pas spécifiques de la dégradation seule de la fibrine, leur augmentation peut témoigner d'une fibrinolyse à proprement dite, mais aussi d'une hyperfibrinogénémie ou d'une hyperfibrinogénolyse, en l'absence d'insuffisance hépatique. (23)

Afin de s'affranchir des formes résultantes de la dégradation du fibrinogène, il est possible de doser les D-Dimères, spécifiques de la dégradation de la fibrine et donc de la fibrinolyse *sensu stricto*.

2. Dosage des D-Dimères :

Comme indiqué précédemment, les D-Dimères sont une forme de PDF spécifique de la dégradation de la fibrine. Ainsi, une augmentation des D-Dimères constitue un bon témoin d'une augmentation du phénomène de fibrinolyse.

Le dosage des D-Dimères est réalisé à partir de sang prélevé sur tube citraté. Il existe plusieurs méthodes de dosage des D-Dimères : turbidimétrie, agglutination, immunofluorescence, ELISA. Mais à l'image du dosage des PDF, c'est la méthode d'immunoagglutination qui est la plus couramment utilisée. (31) Comme pour le dosage des PDF, elle permet d'obtenir de manière semi-quantitative la concentration en D-Dimères du plasma, et d'exprimer les résultats en $\mu\text{g}/\text{mL}$, en ng/mL ou en $\mu\text{g}/\text{L}$.

D. Exploration globale de l'hémostase : thromboélastographie et thromboélastométrie :

La thromboélastographie est un test d'exploration global de l'hémostase qui permet d'évaluer l'initiation, la formation, la stabilisation et enfin la dégradation du caillot sanguin. Il a été mis au point en 1948 par Hartert, puis amélioré dans les années 1980-1990 avec la mise en place de deux types d'automates : le TEG[®] et le ROTEM[®] (on parle de thromboélastométrie rotative dans ce dernier cas). (41)

Le principe est le même pour les deux techniques : le sang total du patient est introduit dans une cuve, dans laquelle plonge un axe, lui-même relié à un système de détection de l'automate. Selon la technique, la cuve ou l'axe sont alors mis en mouvement, et au fur et à mesure de la formation du caillot, la viscosité augmente. Le mouvement détecté est soit restreint (si l'axe est en mouvement), soit amplifié (si la cuve est en mouvement ; mouvement transmis à l'axe qui fonctionne ici comme un fil de torsion). Les modifications d'amplitude sont transmises au système de détection et un graphique est produit par l'automate (figure 7). Il représente les différents temps de formation et de lyse du caillot (figure 8). (31), (41)

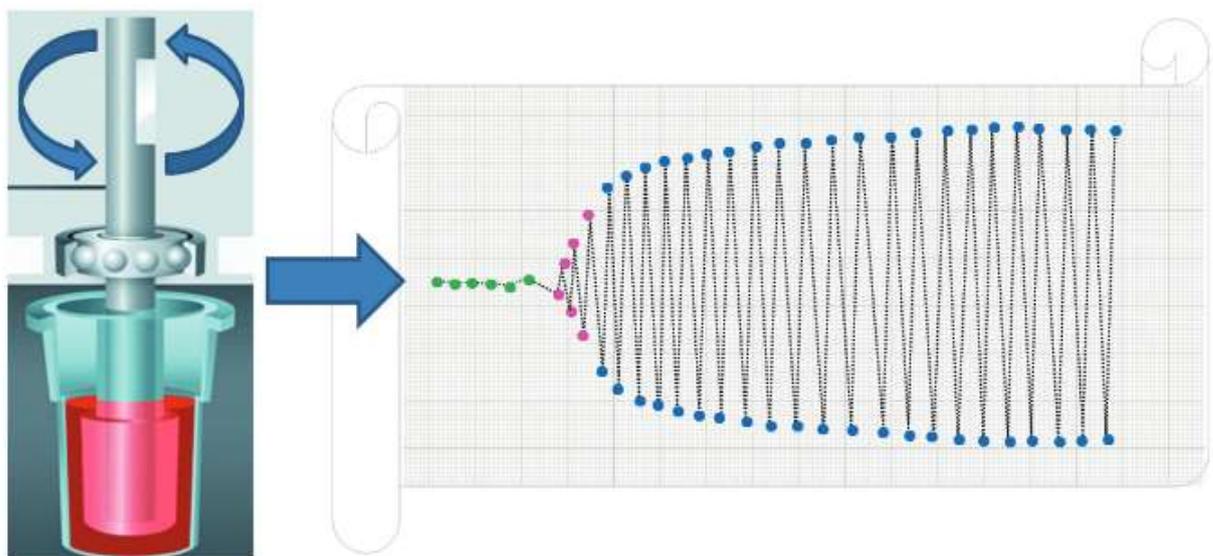


Figure 7 : Conversion des mouvements de l'axe du ROTEM[®] en tracé par détection optique, d'après (3).

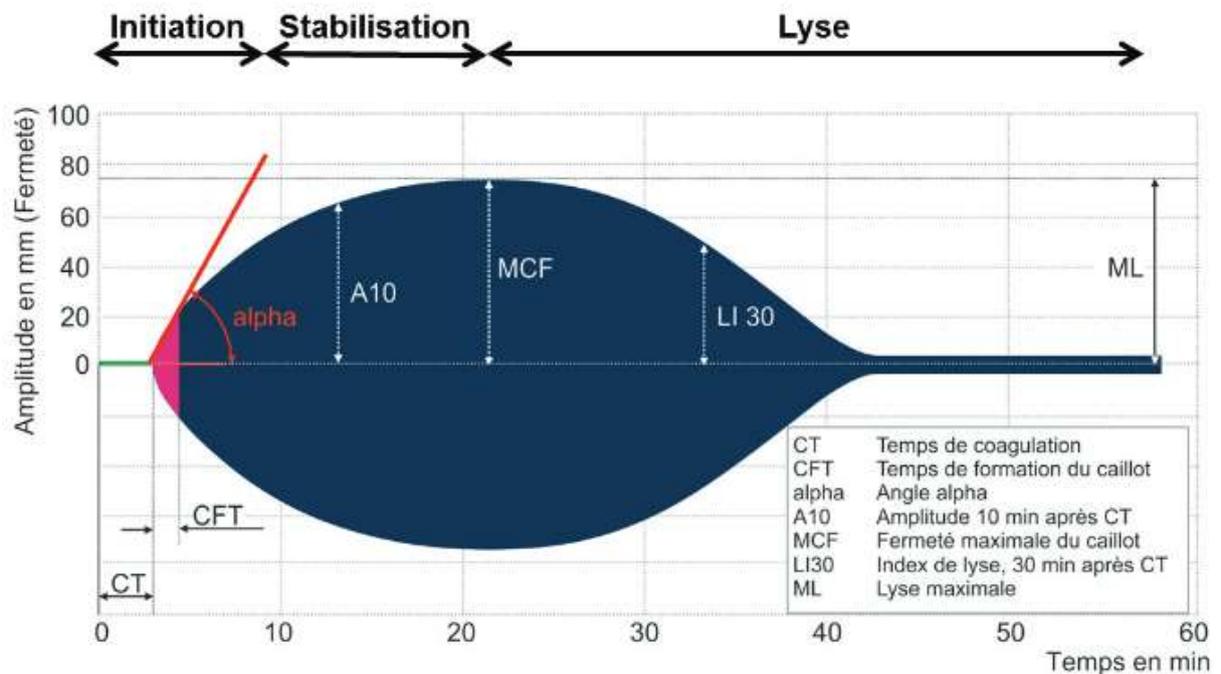


Figure 8 : Tracé théorique et paramètres obtenus par ROTEM®, d'après (3).

Contrairement aux premiers systèmes de thromboélastographie, le TEG® ou le ROTEM® permettent de réaliser des mesures rapidement, et ce grâce à l'ajout d'activateurs spécifiques : ainsi avec le ROTEM, il est possible d'analyser la voie intrinsèque par l'ajout du facteur tissulaire ; la voie extrinsèque, par l'ajout d'acide ellagique ; la formation de la fibrine indépendamment de l'action des plaquettes par l'ajout de cytochalasine D ; la fibrinolyse spécifiquement par l'ajout d'aprotinine. On parlera alors respectivement des analyses ex-TEM, in-TEM, fib-TEM et ap-TEM. (41)

C'est l'interprétation croisée de ces différentes voies d'analyses qui permettra de déterminer le plus précisément possible l'origine d'une anomalie de l'hémostase.

Le sang utilisé est prélevé sur tube citaté, toujours dans de bonnes conditions de prélèvement. (31) En fonction des automates et des activateurs utilisés, les valeurs usuelles des paramètres mesurés peuvent varier d'un laboratoire à l'autre. (31)

En médecine humaine, la thromboélastographie/métrie est utilisée dans le cadre de transfusions sanguines, de chirurgies cardiaques ou hépatiques par exemple, en particulier pour détecter un état d'hypocoagulabilité. En médecine vétérinaire, elle a un intérêt particulier dans les services d'urgence avec la recherche d'états d'hyper ou d'hypocoagulabilité et de possible CIVD ; mais aussi pour affiner le diagnostic d'une pathologie de l'hémostase face à des paramètres de la coagulation anormaux par exemple. (31)

III. Les troubles de l'hémostase secondaire en lien avec les facteurs de coagulation vitamine K dépendants :

A. Les troubles d'origine héréditaire :

1. Hémophilie B :

L'hémophilie B, connue également sous le nom de maladie de Christmas, correspond à un trouble de la coagulation d'origine héréditaire se traduisant par un déficit quantitatif et/ou qualitatif en facteur IX de coagulation. Elle est, après l'hémophilie A (déficit en facteur VIII de coagulation), la deuxième cause la plus fréquente de trouble de l'hémostase secondaire d'origine héréditaire chez l'homme comme chez le chien. Elle survient dans un cas sur 30000 chez l'homme, contre un cas sur 10000 pour l'hémophilie A ; chez le chien, l'hémophilie B est environ 3 à 4 fois moins représentée que l'hémophilie A, un ratio similaire à celui rencontré au sein de la population humaine. (42) (43)

La transmission génétique de la maladie est liée au sexe, et plus précisément au chromosome X, de manière récessive. Ainsi, ce ne sont quasi exclusivement que les individus mâles qui sont touchés par l'hémophilie B (très rares cas de femelles homozygotes). Les femelles hétérozygotes deviendront quant à elles porteuses saines et pourront transmettre la maladie à leur descendance. (42)

Chez le chien, et contrairement à la plupart des maladies héréditaires, l'hémophilie B n'est pas spécifique d'une seule race : les chiens pure race comme les chiens croisés peuvent être atteints ; et jusqu'à 50 races pures ont déjà été concernées par l'hémophilie B. (42), (44) Le gène codant pour le facteur IX chez l'homme est présent sur le bras long du chromosome X. Il est composé de huit exons qui codent chacun pour une partie de la protéine mature finale. Cette structure est à 86% identique d'un point de vue des acides aminés chez le chien. (45), (46), (47)

Plus de 600 mutations du gène codant pour le facteur IX ont été mises en évidence dans le cadre de l'hémophilie B chez l'homme. Chez le chien, 6 mutations ont été identifiées. (48) On retrouve par exemple des mutations non-sens avec substitution d'acide glutamique par de la glycine dans le domaine catalytique de la protéine entraînant une inactivation du facteur IX (49) ; des délétions associées à des substitutions de nucléotides entraînant la formation d'ARNm instables et l'apparition de codons stop précoces dans la région du peptide activateur chez des chiens de race Lhasa Apso (46) ; des insertions Line 1 dans l'intron 5 chez des chiens de race Braques Allemands (43) ; et jusqu'à une délétion complète du gène codant pour le facteur IX chez un chien croisé Labrador Retriever à l'origine d'une hémophilie B sévère. (48),(50)

a) Symptomatologie et diagnostic :

L'hémophilie B se traduit cliniquement chez le chien par l'apparition d'hématomes intramusculaires ou sous-cutanés consécutifs à des traumatismes et notamment à des injections ; par de l'hémarthrose à l'origine de boiteries ; et par des saignements prolongés suite à des traumatismes mineurs, une chirurgie ou des pertes de dents lactéales par exemple.

La sévérité des signes cliniques est directement proportionnelle à l'activité résiduelle du facteur IX présente chez l'animale. Ainsi on parle d'hémophilie B sévère lorsque l'activité dosée du facteur IX est inférieure à 2% de l'activité normale mesurée chez le chien témoin ; d'hémophilie modérée lorsque cette activité est comprise entre 2 et 4% ; et d'hémophilie légère pour une activité comprise entre 5 et 20% de l'activité normale. (42), (43)

Le diagnostic de l'hémophilie B est réalisé à l'aide des tests d'exploration de la coagulation sanguine. Une prolongation du TCA sans prolongation du TQ est attendue, permettant de confirmer une atteinte de la voie intrinsèque de la coagulation. C'est ensuite le dosage plasmatique spécifique de l'activité du facteur IX qui permettra d'exclure l'hypothèse d'hémophilie A et donc de confirmer l'hémophilie B, tout en déterminant la sévérité de l'atteinte.

b) Traitement :

Le traitement d'urgence face à un tableau clinique d'hémophilie B consiste à réaliser une transfusion de sang total ou de plasma afin de permettre un apport en facteur IX. La fréquence de réalisation de ces transfusions se fait principalement en fonction de la sévérité de l'hémophilie et donc de l'activité résiduelle du facteur IX présente chez le chien. (42) On notera qu'un traitement de l'hémophilie B par transfusion de sang total ou de plasma sur du long terme comporte des risques, notamment la transmission de pathogènes sanguins et l'apparition de thrombose. (51), (52)

En dehors de la thérapeutique d'urgence, plusieurs types de traitements peuvent être utilisés dans le cadre de l'hémophilie B. L'utilisation de facteur IX recombinant est possible par injection intraveineuse ou sous-cutanée. En comparant les résultats obtenus après l'injection de facteur IX recombinant et de facteur IX humain hautement purifié chez des chiens hémophiles B, il a été montré que l'efficacité procoagulante et l'innocuité de ces deux moyens thérapeutiques étaient identiques chez le chien. (51)

D'autre part, une étude a permis de mettre en évidence l'efficacité d'une prophylaxie par injection sous-cutanée de facteur IX recombinant chez le chien : une réduction de 69% des saignements liés à la maladie a été notée chez les chiens traités comparés aux chiens non traités. Toutefois, les chiens ayant reçu l'injection sous-cutanée de facteur IX recombinant avait été rendus immunologiquement tolérants au facteur IX humain. (53) Le développement d'anticorps anti-facteur IX humain est en effet un inconvénient de cette thérapeutique, chez le chien comme chez l'homme. (51), (53) Auquel s'ajoutent d'autres contraintes comme le coût du traitement, la répétition des injections ou encore la morbidité. (53), (54)

La thérapie génique correspond à une piste importante de recherche pour le traitement de l'hémophilie B. L'objectif de ce type de traitement est de remplacer le gène défaillant à l'origine de la maladie héréditaire par un gène fonctionnel via l'utilisation par exemple d'un vecteur d'origine virale, afin de mettre fin à l'expression clinique de la maladie. Dans le cas de l'hémophilie, plusieurs vecteurs viraux ont été testés pour assurer le transport puis l'expression du gène codant pour le facteur IX : rétrovirus, adénovirus et adéno-associés virus (AAV). Les deux premiers, bien que permettant une intégration du gène codant pour le facteur IX dans le génome des cellules cibles puis son expression sur le long terme, se sont vu abandonnés en raison des risques importants de mutagénèse (rétrovirus) et de l'existence d'une forte immunogénicité des composants du vecteur (adénovirus).

Une hépatotoxicité associée à l'apparition de thrombopénies étaient également rapportées avec l'utilisation des vecteurs à adénovirus.(55) C'est donc actuellement les AAV ou adénovirus recombinants qui sont utilisés dans le cadre des recherches sur la thérapie génique de l'hémophilie chez le chien. Il a en effet été montré que leur injection par voie intraveineuse (veine porte hépatique) ou par voie intramusculaire, permet l'expression du gène codant pour le facteur IX respectivement au sein des hépatocytes et des fibroblastes des animaux et ce de manière efficace, sur le long terme, et sans toxicité hépatique ou thrombopénie rapportées. Différents sérotypes des AAV, et notamment les AAV-2, sont utilisés dans le cadre de ces thérapies géniques. Un seul inconvénient persiste face à ce traitement : les patients hémophiles traités par thérapie génique peuvent développer des anticorps anti facteur IX. Dans ce contexte, l'effet du traitement sur le long terme s'en voit limité. On notera que les facteurs favorisant l'apparition de ces anticorps sont : le type ou sérotype de vecteur choisi, la voie d'administration du vecteur, la dose de vecteur injectée ou encore le type de promoteur d'expression utilisé. (52), (54), (55), (56), (57), (58), (59)

2. Déficits d'origine génétique en facteurs de coagulation II, VII et X :

a) Déficit en facteur II de la coagulation :

Le déficit héréditaire en facteur II de la coagulation ou prothrombine est une maladie très rare, chez l'homme (1 cas sur 2 000 000) comme chez le chien où seuls quelques cas isolés au sein de certaines races (Boxer, Cocker notamment) ont été mis en évidence. (60) Elle est transmise de façon autosomique récessive : les individus homozygotes sont les plus atteints cliniquement avec des taux de facteur II circulant compris entre 2 et 20 % ; les hétérozygotes sont en général asymptomatiques avec des taux de facteur II circulant d'environ 50 %. (42) À l'image de ce qui a été montré par une étude chez des souris délétées en gène codant pour la prothrombine, il semblerait qu'un déficit complet du gène soit létal chez l'homme et ce dès la vie embryonnaire. Aucun cas de délétion complète en facteur II n'a en effet été rapporté jusqu'ici chez l'homme. (60), (61)

Ce déficit en prothrombine se traduit par deux formes distinctes : soit une hypoprothrombinémie, correspondant à un déficit quantitatif en facteur II de la coagulation, qui est synthétisé de manière fonctionnelle mais en trop faible quantité ; soit une dysprothrombinémie, correspondant à un déficit qualitatif en facteur II de la coagulation, qui est alors synthétisé en quantité normale à subnormale dans le plasma mais de manière non fonctionnelle. De nombreuses mutations génétiques sont à l'origine de ce déficit : 40 ont été identifiées chez l'homme. Elles se répartissent sur l'ensemble du gène codant pour le facteur II et leurs localisations se distinguent suivant que l'on soit face à une hypoprothrombinémie ou à une dysprothrombinémie. (60)

Cliniquement, les symptômes apparaissent quasi exclusivement chez les individus homozygotes. Leur gravité semble proportionnelle à la quantité de prothrombine circulante dans le plasma des individus atteints. On retrouve ainsi des saignements post-traumatiques majoritairement, mais aussi des cas d'hémarthrose, d'épistaxis ou encore de saignements ombilicaux chez les nouveaux nés. (42), (60)

Le diagnostic d'un déficit d'origine génétique en prothrombine est réalisé face à un allongement du TT associé à un taux de dosage spécifique en facteur II faible. (42)

Lors d'hypoprothrombinémie, la quantité d'antigène facteur II diminue également. (60) Le traitement spécifique d'un déficit en prothrombine consiste en l'apport de concentré de prothrombine, bien qu'en pratique il repose sur la réalisation de transfusions de sang total ou de plasma.

b) Déficit en facteur VII de la coagulation :

Le déficit héréditaire en facteur VII de la coagulation est une maladie rare chez le chien comme chez l'homme chez lequel elle apparaît avec une fréquence de 1 cas sur 500 000. Sa transmission est autosomique récessive. (62), (63) La maladie s'exprime donc cliniquement chez les individus homozygotes qui, chez l'homme et chez le chien, présentent des taux de facteur VII circulant compris entre 1 et 10 % de la normale. Les individus hétérozygotes quant à eux sont asymptomatiques et il est donc difficile de les distinguer des individus sains. (42)

Chez le chien, le déficit héréditaire en facteur VII a été décrit pour la première fois en 1962 au sein de la race Beagle. La découverte s'est faite de manière fortuite, les signes cliniques étant faibles au sein de cette race. Depuis, plusieurs études ont confirmé l'existence de cette maladie chez d'autres Beagle aux Etats Unis, en Angleterre ou encore au Canada ou en Europe ; mais aussi chez des chiens de race Malamute, Alaskan Klee Kai et chez un chiot croisé. On notera que chez les chiens de race Malamute et Alaskan Klee Kai la clinique est plus marquée que chez les chiens de race Beagle. (42), (64), (65), (66)

Des études génétiques, menées au sein de la race Beagle, ont permis de mettre en évidence la mutation à l'origine de la maladie chez le chien : elle correspond à une substitution d'une base guanidine G en adénosine A au niveau de l'exon 5 du gène codant pour le facteur VII. Elle est à l'origine de la substitution de l'acide aminé glycine 96 en acide glutamique au niveau du domaine « epidermal growth factor-like ». (62) Plus récemment, la même mutation a été mise en évidence chez des chiens de race Alaskan Klee Kai atteints de la maladie. (65) Pour le moment, aucune investigation n'a été menée au sein d'autres race de chiens. (42)

Chez l'homme, plus de 130 mutations ont été identifiées comme pouvant être à l'origine d'un déficit héréditaire en facteur VII de la coagulation, avec chacune des effets différents sur le mode d'expression ou sur la fonctionnalité de la protéine. (62)

La symptomatologie en lien avec un déficit congénital en facteur VII est variable. Chez le chien, la tendance aux saignements spontanés est légère à modérée, notamment au sein de la race Beagle, bien que quelques cas sévères aient pu être rapportés au sein des races Malamute et Alaskan Klee Kai. La découverte d'un déficit congénital en facteur VII de la coagulation chez le chien est donc majoritairement fortuite, à la faveur d'un contrôle des temps de coagulation sanguine. Cela pourrait s'expliquer par le fait que, chez le chien, la voie extrinsèque reste minoritaire dans le processus de coagulation et qu'un taux circulant même faible en FVII peut suffire à la déclencher. Ont été malgré tout rapportés : des saignements persistants utérins et vaginaux chez une femelle Beagle, une tendance à la formation d'hématomes chez un Malamute ou des saignements persistants post chirurgicaux chez un chien croisé ou post-traumatiques chez un Alaskan Kee Kai. (64), (65), (66)

Chez l'homme en revanche, les signes cliniques sont plus fréquents et souvent plus sévères : hématomes, épistaxis, saignements au niveau des muqueuses et notamment des gencives, hémarthrose, métrorragies, hémorragies intracrâniennes parfois dès la naissance. (63), (67)

Le diagnostic d'un déficit héréditaire en facteur VII de la coagulation est réalisé sur la base d'une prolongation du temps de prothrombine puis, chez l'homme, par le dosage spécifique du FVII dans le plasma. Le traitement mis en place face à des saignements consiste en des transfusions de sang total ou de cryoprécipités riches en FVII. Pour atteindre un taux suffisant de FVII circulant conduisant à l'arrêt des saignements, les transfusions doivent être réalisées de manière répétées toutes les 4 à 6 heures, durée équivalente au temps de demi-vie du FVII. (42) En médecine humaine, l'administration de facteur VII recombinant est aussi utilisée comme moyen thérapeutique face à un déficit héréditaire en facteur VII de la coagulation. (68)

c) Déficit en facteur X de la coagulation :

L'existence d'un déficit héréditaire en facteur X de la coagulation a été pour la première fois décrite chez l'homme en 1956. Depuis, cette maladie a aussi été identifiée chez deux races de chiens, Cocker Américain et Jack Russel Terrier. (69), (70) Chez le chien, le mode de transmission de la maladie est autosomique dominant, contrairement à ce que l'on retrouve chez l'homme où la transmission est autosomique récessive. (70)

Les anomalies génétiques les plus souvent mises en évidence chez l'homme correspondent à des mutations non-sens ou faux-sens au sein du gène codant pour le facteur X de la coagulation. Chez le chien, aucune mutation spécifique n'a encore été identifiée. (42)

Un déficit héréditaire en facteur X de la coagulation se traduit par des symptômes d'intensité modérée à sévère : épistaxis et hématomes spontanés, hémorragies post-traumatiques ou post chirurgicales. Un déficit complet en facteur X apparaît comme étant léthal. (42)

Le diagnostic d'un déficit héréditaire en facteur X de la coagulation s'appuie sur une prolongation du TQ et du TCA (le facteur X participant à la voie commune de la coagulation, un déficit affecte également les voies intrinsèque et extrinsèque de la coagulation) ainsi que du TT. Un dosage spécifique chez l'homme de l'activité du facteur X confirme enfin le diagnostic. Le traitement consiste alors à réaliser des transfusions de sang total pour mettre fin aux saignements.

3. Déficit combiné en facteurs de coagulation vitamine K dépendants :

Le déficit combiné en facteurs de coagulation vitamine K dépendants correspond à une diminution concomitante de l'activité des facteurs de coagulation II, VII, IX et X ainsi que des anticoagulants protéines C et S. C'est une maladie rare chez l'homme pour lequel très peu de cas ont été décrits ; elle a aussi été mise en évidence chez des chats de race Rex Devon, chez des moutons, et plus récemment chez une chienne de race Labrador Retriever âgée de 1 an. (71) Ce déficit héréditaire se transmet de manière autosomique récessive. (42), (71)

Les anomalies génétiques à l'origine de la maladie sont retrouvées soit sur le gène codant pour la γ -glutamyl-carboxylase vitamine K dépendante ; soit sur le gène codant pour le complexe vitamine K époxyde-réductase (VKOR). (42), (71), (72), (73)

Cliniquement, ce déficit se traduit par des saignements intermittents spontanés, des hématomes, des hémorragies post-chirurgicales, ou encore des hémorragies intracrâniennes qui peuvent être fatales chez l'homme.

Le diagnostic est basé sur une prolongation du temps de prothrombine puis sur un dosage des activités des facteurs de coagulation II, VII, IX et X qui sont notablement diminuées. On notera que dans la démarche diagnostique face à une suspicion de déficit combiné en facteurs de coagulation vitamine K dépendants, il convient d'exclure l'ensemble des causes acquises possibles de déficit en vitamine K : atteinte hépatique, intoxication aux rodenticides ou encore syndrome de malabsorption/malassimilation. Le traitement de cette maladie héréditaire consiste en la réalisation de transfusions sanguines en urgence pour mettre fin aux hémorragies ; puis en l'administration de vitamine K1 par voie orale à des doses d'environ 2.5 mg/kg par jour. Sur le long terme, si la thérapeutique est efficace, les doses administrées de vitamine k1 peuvent être réduites, à raison de 1mg/kg/j tous les 3 jours. (42)

B. Les troubles d'origine acquise :

1. Les déficits en vitamine K : intoxication aux anti vitamine K (AVK) et hypovitaminose K :

a) Les intoxications aux AVK :

Les intoxications aux AVK sont des cas courants en médecine vétérinaire, particulièrement en médecine canine, bien que des cas soient aussi décrits chez les chevaux ou encore les oiseaux. (74) La cause principale de ses intoxications aux AVK correspond à l'ingestion par les animaux d'anticoagulants rodenticides. Les molécules AVK, en tant qu'anticoagulants, sont en effet utilisées depuis de nombreuses années dans la gestion des populations de nuisibles et en particulier des rongeurs. Parmi ces derniers, ce sont les rats qui posent le plus de problème à l'échelle de la planète : ils causent de nombreux dégâts dans les villes, se nourrissent des réserves de nourriture dans les pays en voie de développement et participent à l'entretien et à la transmission d'un certain nombre de maladies, comme la leptospirose par exemple. La gestion des populations des rats est donc un enjeu mondial auquel tente de répondre les AVK. En médecine humaine, les anticoagulants AVK sont également couramment utilisés dans le traitement d'affections à l'origine de troubles thromboemboliques artériels ou veineux.

Les anticoagulants AVK sont ainsi classés en trois familles : les dérivés de la 4-hydroxycoumarine, les dérivés de la 4-hydroxy-thiocoumarine et les dérivés de l'indane-1,3-dione. En médecine humaine, seuls les dérivés de la 4-hydroxycoumarine et de l'indane-1,3-dione sont utilisés, représentés respectivement par la warfarine (la plus représentée) et la fluindione. Pour ce qui est de la lutte contre les rongeurs, tous les types de dérivés sont utilisés. Mais la warfarine présentant une faible efficacité dans ce contexte, elle n'est donc presque plus utilisée.

On distingue aussi deux générations d'AVK : la première génération regroupe des AVK (coumafène, chlorophacinone, diphacinone, coumatétralyl) dont l'effet toxique apparaît après des ingestions répétées, leur toxicité est donc faible à modérée, et ils font l'objet de nombreuses résistances chez le rat comme chez l'homme ; la seconde génération regroupe des AVK (bromadiolone, difénacoum) dont l'effet toxique apparaît après une seule ingestion, leur toxicité est donc plus importante, ils font l'objet de très peu de résistances. De nouvelles molécules telles que le brodifacoum, le diféthialone ou le flocoumafène, font partie de la seconde génération mais sont plus récentes et donc encore plus toxiques.

Tous les AVK présentent une structure proche de celle de la vitamine K ce qui explique leur mode d'action. Pour rappel, les apports journaliers en vitamine K par l'alimentation sont insuffisants. D'où l'existence d'un cycle de recyclage de la vitamine K au sein des hépatocytes, mettant en jeu deux enzymes : la vitamine K réductase permettant le passage de la forme quinone à la forme hydroquinone de la vitamine K (étape non limitante) ; et la vitamine K époxyde réductase (VCOR) permettant le passage de la forme époxyde à la forme quinone de la vitamine K (étape limitante car ne pouvant être remplacée par aucune autre voie). Les AVK sont des inhibiteurs de ces deux enzymes : ils se fixent sur leurs sites de fixation de la vitamine K, empêchent donc la fixation de cette dernière, et entraînent l'arrêt du cycle de recyclage de la vitamine K (figure 9). C'est principalement leur action sur VCOR qui est problématique car aucune autre voie ne peut être utilisée pour cette phase du recyclage. En résulte une diminution de la quantité de vitamine K hydroquinone, et donc une diminution puis un arrêt de la γ -carboxylation des facteurs de coagulation vitamine K dépendants. Ces derniers n'étant plus γ -carboxylés (PIVKA), ils perdent leur capacité à chélater le calcium et donc à se fixer aux phospholipides plaquettaires, ce qui met fin à la cascade de la coagulation sanguine.

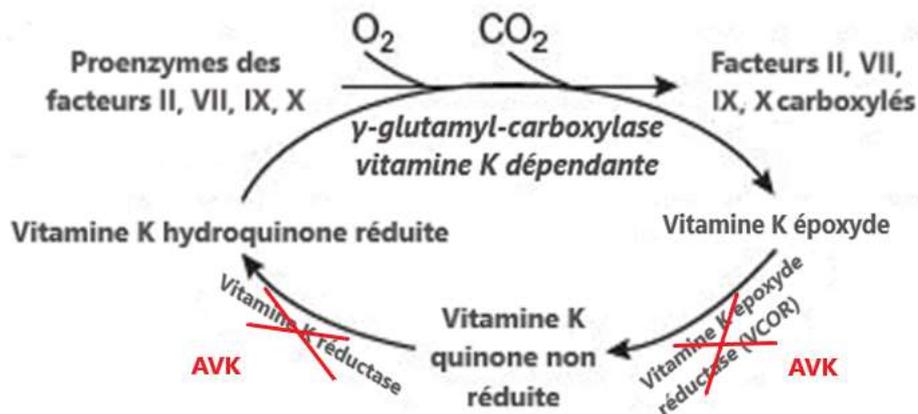


Figure 9 : Mode d'action des AVK au sein du cycle de la vitamine K.

Toutefois, il est à noter que l'action réelle sur l'hémostase secondaire n'est pas immédiate. L'organisme possède en effet une réserve de facteurs de coagulation activés au moment de l'intoxication, ainsi qu'une réserve en vitamine K dont la disponibilité est de 24h. Ainsi il faut au minimum 48h avant une action réelle sur l'hémostase, et le temps d'élimination totale des facteurs de coagulation dépendra ensuite de leur temps de demi-vie : le facteur VII sera le premier impacté. Ceci explique que le TQ soit le test d'exploration de choix en cas d'intoxication aux AVK, bien que le TCA soit aussi augmenté. Le TT reste quant à lui dans les valeurs usuelles. Cliniquement, on observera des symptômes au minimum 48h après l'ingestion des AVK. Il s'agira d'hémorragies en nappe, sans localisation préférentielle. On peut donc observer de l'épistaxis, de l'hématémèse, du méléna, de l'hématurie, des hémorragies pleurales ou intra abdominales, ou encore des hématomes. De la dyspnée, des boiteries voire des convulsions en cas d'hémorragies cérébrales ; des muqueuses pâles, une tachycardie pourront être des symptômes consécutifs aux signes cliniques précédemment cités.

Le traitement mis en place dans le cas d'une intoxication consiste en l'administration de vitamine K1, par voie intraveineuse dans un premier temps puis par voie orale, pendant 3 à 6 semaines selon le type d'AVK ingéré.

Un suivi du TQ est nécessaire 48h après l'arrêt du traitement : s'il est toujours augmenté, l'administration de vitamine K1 est poursuivie. Dans le cas d'une intoxication avec signes cliniques sévères, une transfusion sanguine (sang total ou plasma) pourra être réalisée. (74)

b) Les hypovitaminoses K :

Les hypovitaminoses K sont rarement suffisamment importantes pour créer une réelle coagulopathie avec diminution des facteurs de coagulation vitamine K dépendants γ -carboxylés. (2) Pour rappel, la vitamine K fournie par l'alimentation est absorbée au niveau des intestins, ou est directement produites par les bactéries intestinales ; la vitamine K est une molécule liposoluble. Ainsi, les causes des hypovitaminoses K, bien qu'elles ne soient pas encore clairement identifiées, regroupent chez l'homme : une anorexie prolongée ou une alimentation carencée en vitamine K ; des antibiothérapies répétées ou administrées sur le long terme ; un phénomène de malabsorption intestinale lié à une obstruction biliaire, une cholestase intrahépatique, une insuffisance pancréatique exocrine, une Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin (MICI), l'ensemble étant à l'origine d'une diminution de la digestion des molécules lipidiques et donc aussi de la vitamine K. (2), (74) En dehors des affections hépato-biliaires, ce phénomène n'a été que très peu étudié chez les carnivores domestiques.

De la même manière que pour les intoxications aux AVK, en cas d'hypovitaminose K suffisamment marquée, le cycle de recyclage de la vitamine K ne peut pas être maintenu et on observe un arrêt ou un défaut de la γ -carboxylation des facteurs vitamine K dépendants. La concentration des PIVKA augmente alors dans le sang et l'hémostase secondaire ne peut rapidement plus être réalisée. Les méthodes diagnostiques et les traitements mis en œuvre dans un contexte d'hypovitaminose K sont identiques à ceux mis en place face à une intoxication aux AVK.

2. Les maladies hépatiques :

Le foie joue un rôle primordial dans la régulation de l'hémostase par son action de synthèse des protéines pro/anti-coagulantes et pro/anti-fibrinolytique, mais aussi en étant le lieu de l'activation des protéines vitamines K dépendantes que sont les facteurs de coagulation II, VII, IX et X ainsi que les protéines C et S. Le foie est également le lieu d'élimination des protéines et enzymes formées au cours du processus d'hémostase. L'ensemble permettant de préserver l'organisme contre les hémorragies ou l'extension de la formation du caillot sanguin.

Il apparaît donc que toute maladie hépatique ou hépatobiliaire peut être à l'origine d'anomalies acquises de l'hémostase.(75), (76) Il a ainsi été montré que chez des chiens souffrant d'une maladie hépatique d'origine acquise et à développement spontané, 93% présentaient au moins une anomalie des tests d'exploration de l'hémostase, avec augmentation du TQ dans 50% des cas et du TCA dans 75% des cas. Chez des chiens souffrant de maladies des voies hépatobiliaires, des concentrations plus faibles en facteurs de coagulation VII et X ainsi qu'en protéine C et en fibrinogène étaient constatées par rapport à celles retrouvées chez des chiens sains et, chez des chiens souffrant de cirrhose hépatique, une diminution de l'activité des facteurs II, VII, VIII, IX, X, XI et XII. (75), (77)

Chez l'homme, une maladie hépatique d'origine aiguë ou chronique est régulièrement accompagnée d'une diminution du taux de protéines vitamine K dépendantes, et en particulier du facteur VII et de la protéine C. Il est également possible, notamment dans les cas de maladies hépatiques au stade terminale ou de cirrhose hépatique, que l'activité des activateurs de l'hémostase soit augmentée et conduisent ainsi à un phénomène de CIVD. (75). D'autres anomalies de l'hémostase peuvent aussi être rencontrées chez l'homme comme chez le chien : thrombopénie, thrombopathies fonctionnelles, augmentation ou non de l'activité fibrinolytique. (76)

Sur le plan clinique, la gravité des symptômes est liée au degré de l'insuffisance hépatique : des hémorragies sont rencontrées dans les formes terminales de maladies hépatiques ou celles accompagnées d'un phénomène de CIVD ; pour les formes aiguës ou moins avancées, les manifestations hémorragiques restent faibles à modérées.(74) La principale difficulté face à des patients atteints de maladies hépatiques réside dans l'évaluation du risque hémorragique en cas d'intervention chirurgicale ou de la réalisation d'un acte de biopsie. Il apparaît que chez le chien, une augmentation du TQ et du TCA ainsi qu'une hypofibrinogénémie sont des facteurs de risques hémorragiques importants ainsi que de facteurs pronostiques négatifs. (74) Les traitements mis en place afin de limiter les signes cliniques liés aux anomalies acquises de l'hémostase consistent principalement en l'administration de vitamine K1 (notamment dans le cas de cholestase) et en la réalisation de transfusions sanguines dans les formes les plus sévères ; le tout associé à un traitement spécifique de l'insuffisance hépatique.

3. Les CIVD :

Les phénomènes de CIVD se définissent comme des états d'hypercoagulabilité. La formation de thrombine n'est plus contrôlée, soit parce que les acteurs de la coagulation sont présents en excès, soit parce que le système de régulation est dépassé. Le processus de coagulation s'étend ainsi rapidement à l'ensemble de la circulation générale et apparaissent des thrombi multiples dans la microcirculation sanguine. Ces derniers peuvent être à l'origine secondairement de défaillances organiques, par favorisation de phénomènes ischémiques. Une hyperfibrinolyse est aussi constatée, mais elle ne permet en général pas de contrôler le phénomène. En résulte en revanche une production importante de PDF et D-Dimères, possédant des propriétés anticoagulantes. Les CIVD sont des complications fréquentes de nombreuses affections (néoplasies, maladies hépatiques, processus inflammatoires, etc.), elles sont donc peu spécifiques.

Cliniquement elles se manifestent le plus souvent paradoxalement par des symptômes de type hémorragique. Les plaquettes et les facteurs de coagulation finissent en effet par être rapidement et entièrement consommés. A l'heure actuelle, le diagnostic des CIVD est réalisé en mettant en évidence une thrombopénie, et/ou un allongement des temps de coagulation et/ou une augmentation des PDF et D-Dimères, et/ou une hypofibrinogénémie, et/ou une diminution de l'activité de l'antithrombine III, et/ou la présence de schizocytes sur le frottis sanguin. Au moins trois de ces anomalies doivent être rassemblées pour envisager l'existence d'une CIVD, en association avec une clinique favorable.

Le traitement des CIVD est complexe, notamment parce qu'elles correspondent à des états résistants aux transfusions sanguines. Il faudra donc souvent de grandes quantités de plasma pour assurer un maintien de l'hémostase.

Partie II : Expérimentale :

I. Objectifs :

Le premier objectif de cette étude expérimentale consiste à développer et à valider une méthode de dosage des facteurs vitamine K dépendants II, VII, IX et X chez le chien, à l'aide d'un automate Konelab 20 Thermo Scientific (Thermofisher, France), en utilisant une méthode chromogénique. Pour cela, les protocoles de dosages de facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez l'homme mis en place par le laboratoire Hyphen BioMed seront utilisés et réadaptés à l'espèce canine. Le second objectif de ce travail est d'établir des valeurs usuelles des facteurs II, VII, IX et X chez le chien, à partir d'une population de chiens sains. Un dernier objectif consistera à réaliser une première approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien, en appliquant les méthodes de dosage établies préalablement à des échantillons pathologiques et en comparant les valeurs obtenues avec une population de chiens sains.

De sorte que, ces objectifs atteints, un nouveau test sensible, spécifique et précoce soit disponible et permette une approche plus fine de l'hémostase, notamment dans des contextes de coagulopathies d'origine héréditaire, d'état de déficience en vitamine K ou en γ -carboxylation, ou encore d'état d'hypercoagulabilité. Il pourrait alors être possible de déterminer si certains facteurs sont plus ou moins impactés dans des contextes pathologiques définis et ainsi choisir le ou les plus judicieux à doser en pratique dans ces mêmes contextes. Une utilisation en routine pourrait ensuite être envisagée, dans les domaines de la clientèle ou de la recherche.

II. Matériel et méthode :

A. Ethique, information aux propriétaires et gestion des données :

1. Comité d'éthique :

Afin de pouvoir être menée dans les conditions réglementaires d'éthique et de protection du bien-être animal, notre étude a fait l'objet d'une présentation au Comité d'Ethique de VetAgro Sup Campus de Lyon dans le but de pouvoir être évaluée dans son contexte scientifique, technique et éthique. Afin d'obtenir des échantillons sanguins utilisables pour la réalisation des objectifs de l'étude, il a été en effet nécessaire de réaliser des ponctions veineuses sur des chiens sains. Dans ce cadre, une présentation du projet et de ses objectifs a été effectuée par écrit, de manière à exposer notamment la balance bénéfices/risques de la réalisation des ponctions sanguines chez des chiens sains. Après évaluation, le projet d'étude a été approuvé par le Comité d'Ethique précédemment cité (annexe 1).

2. Informations aux propriétaires et gestion des données :

Les propriétaires des chiens prélevés au cours de ce projet ont été tenus informés des objectifs et des bénéfices/risques liés à l'acte de prise de sang, par voie orale ainsi que par voie écrite via une lettre d'information (annexe 2). Un consentement éclairé (annexe 3) leur est de plus présenté pour signature afin qu'ils puissent témoigner de leur volonté de participer à l'étude en toute connaissance de cause.

Les données collectées en lien avec les propriétaires des animaux prélevés dans le cadre de cette étude restent confidentielles. Les échantillons traités et les résultats obtenus suite à la réalisation des dosages sont ainsi archivés à l'aide d'un numéro de dossier indiqué comme suit : « Validation – XXX » et « Ref-XXX ».

B. Matériel :

1. Populations étudiées :

- a) Pour la validation des méthodes de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien : la population de chiens « Validation » :

Afin d'atteindre le premier objectif de notre étude, à savoir valider des méthodes de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien, une population de chiens a été utilisée : les chiens « Validation ». Elle regroupe 25 échantillons de sang prélevés, dans le cadre de notre campagne de prélèvements, par ponction veineuse jugulaire ou céphalique, sur des chiens considérés comme sains à partir de bases anamnestiques et cliniques uniquement : un recueil de l'anamnèse et un examen clinique complet ont été réalisés en amont des prises de sang. Les chiens « Validation » rassemblent des chiens de tout âge ; mâles ou femelles, stérilisés ou non ; et sans appartenance définie à une race.

Après prélèvement, le sang a été centrifugé (5min à 5 000 tours/min) dans les 4 heures post ponction veineuse. Une partie du plasma a été utilisée pour réaliser un temps de Quick ; le reste a été réparti en plusieurs aliquots de 250µL et congelé à -80°C, en attendant d'être utilisés dans le cadre de cette étude.

- b) Pour l'établissement des valeurs de référence des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien : les chiens « Ref » :

i. Nombre de sujets :

Afin d'établir des intervalles de référence des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien, l'objectif est de récolter 120 échantillons sanguins de chiens sains. Les valeurs de référence sont en effet classiquement reportées sous la forme d'intervalles reprenant 90 à 95% des valeurs obtenues chez une population de référence saine. L'objectif est d'inclure un minimum de 120 animaux afin de déterminer les valeurs de référence par des méthodes non paramétriques ou par des tests paramétriques si la distribution est de type Gaussienne, avec un intervalle de confiance à 95%.

Ce nombre est celui actuellement recommandé afin de maximiser l'exactitude et la précision de l'intervalle obtenu. (78) Néanmoins, il est possible que ce nombre ne puisse être atteint pendant la durée prévue de l'étude. Les résultats resteront interprétables, même statistiquement : d'autres méthodes statistiques sont applicables dès 20 individus et la publication et l'utilisation de valeurs de référence à partir d'un plus faible échantillon est commune à l'heure actuelle en médecine vétérinaire. (78)

Les chiens prélevés appartiennent à des propriétaires (étudiants et membres du personnel de VetAgro Sup, propriétaires consultants au CERREC (Centre d'Etude et de Recherche en Reproduction et Elevage Canin)) ou à l'ICBL (Institut Claude Bourgelat).

ii. Critères d'inclusion à l'étude :

Pour participer à l'étude et faire partie des individus de la population de référence, les chiens « Ref » devront répondre aux critères suivants :

- Être un chien adulte, c'est-à-dire âgé de plus d'un an ;
- Être une femelle ou un mâle, stérilisé(e) ou non ;
- Ne pas avoir présenté de signes cliniques généraux dans les deux semaines précédant ou suivant la réalisation du prélèvement sanguin ;
- Présenter un examen clinique dans les normes. On notera qu'en l'absence d'autre anomalie rapportée dans l'anamnèse ou mise en évidence lors de l'examen clinique, l'auscultation d'un souffle cardiaque n'est pas un critère d'exclusion de l'étude ;
- Et enfin, présenter des résultats d'analyses biochimique et hématologique dans les normes suite au traitement de l'échantillon sanguin prélevé.

iii. Critères d'exclusion de l'étude :

Au contraire, ne seront pas inclus dans l'étude les animaux qui répondent aux critères suivants :

- Animal dont la ponction veineuse a été difficile ou dont l'échantillon est hémolysé ou présente un temps de prothrombine augmenté ;
- Animal non coopératif ou agressif dont le prélèvement est impossible malgré l'utilisation de moyens de contention adaptés ;
- Animal malade, en gestation ou en lactation ;

c) Pour une approche de l'intérêt clinique :

Pour répondre au dernier objectif de ce travail, et ainsi aborder l'intérêt clinique du développement des méthodes de dosage des facteurs vitamine K dépendants chez le chien, trois catégories de populations au profil dit pathologique ont été étudiées : une population de chiens intoxiqués aux anti vitamine K (AVK) nommée chiens « AVK » ; une population de chiens atteints de maladies infectieuses présumées de type leptospirose, nommée chiens « Lepto » ; et une population de chiens souffrant d'insuffisance rénale chronique (IRC), nommée chiens « IRC ».

i. Les chiens « AVK » :

Les échantillons sanguins issus de cette population ont été récupérés au sein du service de l'USC 1233, suite au travail de thèse doctorale de Marlène Damin.

Les chiens « AVK » utilisés pour la validation des méthodes de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants rassemblent des chiens de tout âge ; mâles ou femelles stérilisés ou non ; sans appartenance définie à une race ; et ayant été diagnostiqués comme intoxiqués aux AVK. Le sang a été prélevé par ponction veineuse, sur tube citraté puis centrifugé 10min à 3000 tours/min. Le plasma a ensuite été aliquoté pour réaliser les analyses et les dosages nécessaires au travail de thèse de Marlène Damin. Le restant des plasmas a ensuite pu être récupéré pour cette étude et congelé à -80°C, en attendant la réalisation des dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants.

Le dosage de ces échantillons permettra dans le cadre de cette étude de vérifier qu'il y a bien mise en évidence d'une différence d'activité des facteurs II, VII, IX et X comparée aux résultats des chiens « Ref », en utilisant les méthodes de dosage définies au préalable au cours des phases de validation. Il fournira également une première approche de l'intérêt clinique de ces dosages chez le chien, étant donné la forte prévalence d'apparition de ces intoxications dans cette espèce et l'utilité pressentie de l'existence de tels dosages dans la démarche diagnostique en routine.

ii. Les chiens « Lepto » et « IRC » :

Les échantillons sanguins issus de ces populations ont été récupérés au sein d'une banque d'échantillons du service de biologie médicale de VetAgro Sup Campus de Lyon. Ils correspondent à des échantillons de sang prélevés sur tubes citratés et envoyés au laboratoire de biologie médicale pour analyses biochimique et hématologique dans des contextes de suspicion de leptospirose ou d'IRC chez des chiens malades. Suite à la confirmation de ces hypothèses diagnostiques ou de leur très forte suspicion, le plasma restant à l'issue des analyses sanguines a été aliquoté puis congelé à -80 °C en attendant la réalisation des dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants.

Le dosage de ces échantillons permettra, dans le cadre de cette étude, d'effectuer une approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien dans des contextes pathologiques pouvant influencer le taux d'activité des facteurs II, VII, IX et X. Il apparaît en effet que dans les cas de leptospirose un état hypercoagulable s'installe et ainsi une consommation des facteurs de coagulation circulants mais également, dans certains cas, une hépatite aigüe ou une cholestase pouvant altérer la synthèse de protéines vitamine K dépendantes actives. Dans les cas d'IRC, une diminution des taux de facteurs de coagulation peut être attendue d'après les données observées en médecine humaine.

2. Déroulement des prélèvements pour les chiens « Ref » et traitement des échantillons sanguins :

Les participants à l'étude sont accueillis au sein du CHEVAC (Centre Hospitalier d'Enseignement Vétérinaire des Animaux de Compagnie) ou du CERREC ou rejoint directement au chenil pour les chiens de l'ICBL.

Un numéro « PVKD-XXX » (Protéines Vitamine K Dépendantes) leur est attribué, associé à leur numéro de dossier Clovis (logiciel informatique de gestion des données des animaux au sein des cliniques de VetAgro Sup). Une lettre d'information est fournie au propriétaire de l'animal puis un consentement éclairé pour signature et un questionnaire à propos de l'animal et de son mode de vie afin de recueillir une anamnèse. Un examen clinique complet est réalisé au cours de la consultation, en amont de la réalisation du prélèvement sanguin. Les prises de sang sont effectuées par des étudiants vétérinaires formés à la réalisation de cet acte, sous la supervision d'un vétérinaire diplômé ; ou directement par un vétérinaire diplômé.

Les sites des ponctions veineuses correspondent aux veines jugulaires et la quantité de sang prélevé doit permettre de remplir pour chaque chien : un tube citraté de 3,6mL, un tube hépariné de 3,6mL et un tube EDTA de 1mL (cités dans l'ordre de priorité de prélèvement), soit un volume maximum à prélever de 9mL par chien. On notera que le tube hépariné est mis à l'abri de la lumière immédiatement après le prélèvement, de manière à éviter une détérioration de la vitamine K photosensible.

Les tubes citraté et hépariné prélevés sont ensuite centrifugés (5min à 5 000 tours/min) dans les 4 heures post-prélèvement. Une partie des plasmas ainsi obtenus est utilisée pour la réalisation des analyses biochimiques (urée, créatinine, PAL, ALAT, protéines totales, albumine, bilirubine, calcium total et phosphate) et des temps de coagulation (TQ, TCA). Le plasma restant est aliquoté en suivant les protocoles indiqués dans l'annexe 4 puis congelé à -80°C en attendant d'être utilisé pour la réalisation des dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants.

Le sang prélevé sur tube EDTA est quant à lui utilisé pour réaliser une numération formule sanguine (associé à un frottis sanguin en cas d'anomalie). Puis le sang total restant est aliquoté et congelé à -80°C (annexe 4) pour la réalisation d'analyses génétiques dans le cadre d'une autre étude. L'ensemble de ces analyses hémato-biochimiques ont pour but de confirmer le statut sain de l'animal prélevé.

3. Matériel de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants :

Le dosage des facteurs de coagulation II, VII, IX et X est réalisé à l'aide d'un automate Konelab 20 Thermo Scientific (Thermofisher, France) par méthode chromogénique. D'autre part, il a été utilisé pour effectuer ces dosages des kits de réactifs Hyphen BioMed : Biophen CS-01 (38), Biophen Factor VII, Biophen Factor IX, Thrombin chromogenic substrat Biophen Factor X, et Biophen Plasma Calibrator.

C. Méthode :

1. Principes de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien et méthodes de validation :

Afin de déterminer les protocoles de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien, nous nous sommes appuyés au sein de cette étude sur les protocoles de dosage existants en médecine humaine (annexe 5). Ces derniers sont des protocoles qui ont été établis par le laboratoire Hyphen BioMed dans un cadre de recherche uniquement (et non diagnostic).

Ils se basent sur des méthodes chromogéniques de détermination in vitro de l'activité des facteurs dosés, à partir de plasmas humains citratés ; le tout réalisé soit de manière manuelle, soit à l'aide d'un automate Konelab 20. C'est donc à partir des protocoles de dosage humains automatisés préexistants que nous avons travaillé pour déterminer des protocoles de dosage adaptés aux chiens. Le principe des dosages de chaque facteur vitamine K dépendant, ainsi que la méthode mise en place pour valider les protocoles de dosage de ces mêmes facteurs chez le chien, sont détaillés ci-dessous.

i. Principe du dosage du facteur II de la coagulation :

Le dosage du facteur II de la coagulation se base sur le principe suivant : l'échantillon de plasma citraté est mis en présence avec du venin de serpent *Echis carinatus* (PT1) qui déclenche l'activation du facteur II en facteur II activé. Puis un substrat chromogénique spécifique de la thrombine (PT2) est ajouté à la réaction. Il est hydrolysé par le facteur II activé ce qui déclenche la libération d'un groupement chromophore, la para-nitroaniline (pNA). Cette dernière est alors mesurée par densité optique (DO) à la longueur d'onde de 405 nanomètres (nm) (figure 10). Le taux de facteur II est ainsi proportionnel à celui du facteur II activé qui lui-même est proportionnel à la quantité de pNA libérée et déterminée à 405nm.

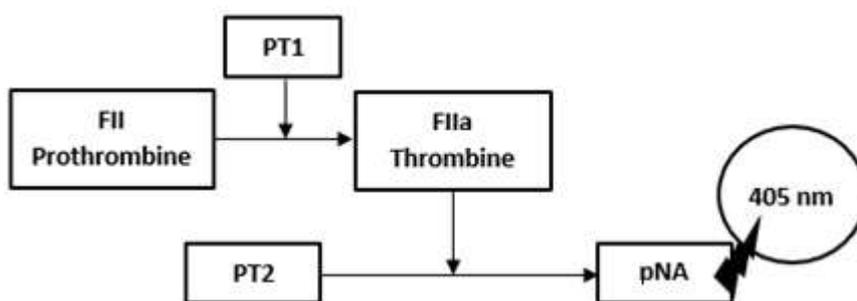


Figure 10 : Schéma simplifié de la réaction de dosage du facteur II de la coagulation.

On notera que, dans le cadre de notre étude, les réactions mises en jeu lors de ce dosage sont directes et ne nécessitent donc pas d'interaction entre des protéines d'origine humaine et des protéines d'origine canine.

ii. Principe du dosage du facteur VII de la coagulation :

Le dosage du facteur VII de la coagulation se base sur le principe suivant : l'échantillon de plasma citraté est mis en présence avec de la thromboplastine (de lapin) calcique (R2) puis de facteur X humain (R1) en excès. Le facteur VII contenu dans l'échantillon forme alors un complexe enzymatique avec la thromboplastine ([FVII-R2]), le calcium et des phospholipides, ce qui permet l'activation du facteur X humain en facteur X activé. Un substrat spécifique du facteur X activé (Sxa-11) est ensuite ajouté à la réaction. Il est clivé par le facteur X activé formé précédemment, libérant de la pNA. Cette dernière est ensuite mesurée par densité optique à la longueur d'onde de 405nm (figure 11). Le taux de facteur VII présent dans le plasma à doser est ainsi proportionnel à celui du facteur X activé, qui est lui-même proportionnel à la quantité de pNA libérée et déterminée à 405nm.

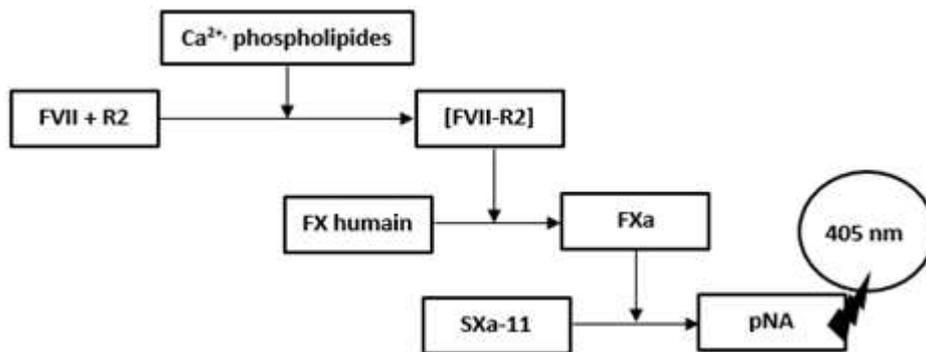


Figure 11 : Schéma simplifié de la réaction de dosage du facteur VII de la coagulation.

On notera que, dans le cadre de cette étude, les réactions mises en jeu lors de ce dosage ne sont pas directes et nécessitent donc des interactions entre des protéines d'origine humaine et des protéines d'origine canine.

iii. Principe du dosage du facteur IX de la coagulation :

Le dosage du facteur IX de la coagulation se base sur le principe suivant : l'échantillon de plasma citraté est mis en présence avec de la thrombine, des phospholipides, du calcium et du facteur XI humain activé, l'ensemble constituant le réactif R1. Puis il est mis en présence de facteur VIII:C et de facteur X humains, contenus dans le réactif R2. R1 et R2 sont apportés en excès et de manière constante, rendant le facteur IX de l'échantillon limitant pour la réaction. Le facteur XI activé permet l'activation du facteur IX de l'échantillon en facteur IX activé. Ce dernier forme alors un complexe avec le facteur VIII:C activé par la thrombine, les phospholipides et le calcium ([FIXa-VIII :C-phospholipides-Ca²⁺]). Ce complexe permet à son tour l'activation du facteur X humain en facteur X activé. Le SXa-11 est alors ajoutée à la réaction. Le facteur X activé clive ce substrat chromogène ce qui entraîne la libération de pNA. Cette dernière est ensuite mesurée par densité optique à la longueur d'onde de 405nm (figure 12). Le taux de facteur IX présent dans le plasma à doser est ainsi proportionnel à celui du facteur X activé, qui est lui-même proportionnel à la quantité de pNA libérée et déterminée à 405nm.

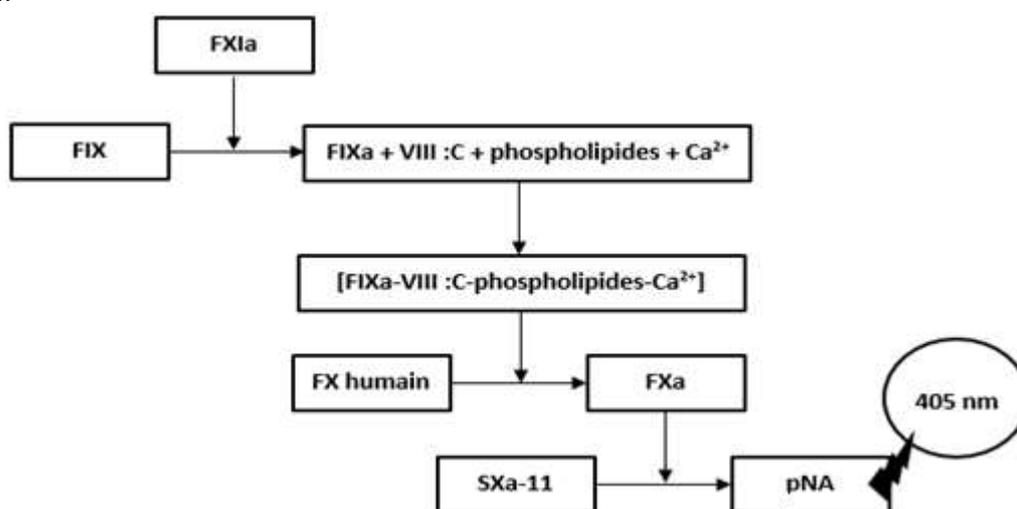


Figure 12 : Schéma simplifié de la réaction de dosage du facteur IX de la coagulation.

On notera que, dans le cadre de cette étude, les réactions mises en jeu lors de ce dosage ne sont pas directes et nécessiteront donc des interactions entre des protéines d'origine humaine et des protéines d'origine canine.

iv. Principe du dosage du facteur X de la coagulation :

Le dosage du facteur X de la coagulation se base sur le principe suivant : l'échantillon de plasma citraté est mis en présence avec du venin de vipère de Russell (R2). Cette dernière permet l'activation du facteur X de l'échantillon en facteur X activé. Du SXa-11 (R1) est ensuite ajouté à la réaction. Le facteur X activé clive ce substrat chromogène ce qui entraîne la libération de pNA. Cette dernière est ensuite mesurée par densité optique à la longueur d'onde de 405nm (figure 13). Le taux de facteur X présent dans le plasma à doser est ainsi proportionnel à celui du facteur X activé, qui est lui-même proportionnel à la quantité de pNA libérée et déterminée à 405nm.

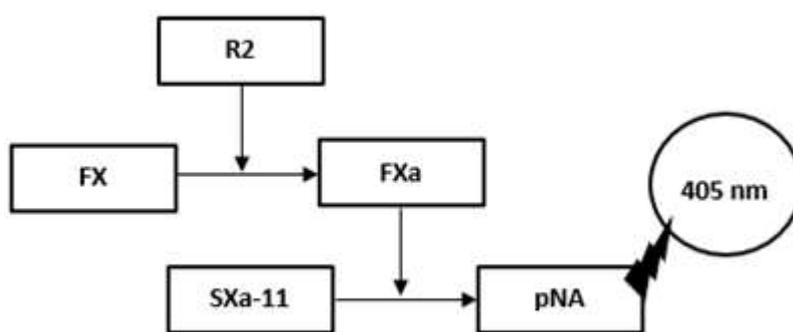


Figure 13 : Schéma simplifié de la réaction de dosage du facteur X de la coagulation.

On notera que, dans le cadre de cette étude, les réactions mises en jeu lors de ce dosage sont directes et ne nécessiteront donc pas d'interaction entre des protéines d'origine humaine et des protéines d'origine canine.

2. Méthode de validation des dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien :

Afin de réaliser la validation d'une méthode de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendant chez le chien, et ce à partir des protocoles humains préexistants, nous avons procédé comme suit :

- Linéarité des dosages :

Afin de contrôler la linéarité des méthodes de dosage des différents facteurs, nous avons réalisé pour chacun d'entre eux des gammes de dilution de plasmas citratés des chiens « Validation » puis l'application d'une régression linéaire à partir des résultats obtenus. Les gammes de dilution s'étendaient de l'échantillon pur à l'échantillon dilué au 1/100^{ème} pour le facteur II ; de l'échantillon dilué au 1/200^{ème} à l'échantillon dilué au 1/6400^{ème} pour le facteur VII ; de l'échantillon pur à l'échantillon dilué au 1/640^{ème} pour le facteur IX ; et de l'échantillon pur à l'échantillon dilué au 1/20^{ème} pour le facteur X.

Les dosages ont été réalisés en cinétique et/ou en point final selon les facteurs, afin de déterminer la méthode de dosage la plus sensible et la plus linéaire. À partir des résultats obtenus durant cette phase de validation, les protocoles de dosage des facteurs vitamine K dépendants chez le chien ont été établis.

- Gammes d'étalonnage :

Afin de s'assurer que la dilution choisie pour le dosage de chaque facteur lors de la première phase de validation puisse être contrôlée par une gamme étalon humaine, nous avons ensuite réalisé des gammes d'étalonnage pour chaque facteur à partir du Plasma Calibrator Biophen humain et selon les protocoles indiqués par le laboratoire Hyphen BioMed. Des équivalences de pourcentage d'activité entre les facteurs vitamine K dépendants humains et ceux des chiens « Validation » dosés ont ainsi pu être déterminées et les dilutions de dosage des échantillons confirmées ou éventuellement modifiées.

- Répétabilité, reproductibilité et stabilité avec influence des conditions de conservation :

Après les deux premières phases de validation, la répétabilité et la reproductibilité des méthodes de dosage des facteurs II, VII, IX et X ; ainsi que l'influence des conditions de conservation des plasmas citratés des chiens « Validation » ont été testés, afin de déterminer la précision des méthodes de dosage. Pour cela ont été effectués :

- Pour la reproductibilité : dosages en duplicata de 5 échantillons à plusieurs jours d'intervalle.
- Pour la stabilité avec influence des conditions de conservation : dosage en duplicata à 5 jours d'intervalle de 5 échantillons conservés entre 2 et 8 °C après 1^{ère} décongélation ; dosages en duplicata de 5 échantillons après un cycle 1^{ère} décongélation-recongélation-2^{ème} décongélation.
- Pour la répétabilité : dosages en duplicata d'un échantillon 5 fois le même jour.

3. Etablissement des valeurs de référence chez le chien :

Les dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants sur des plasmas citratés des chiens « Ref » ont été réalisés à partir des protocoles de dosage mis en place chez le chien lors de la phase de validation. Chaque échantillon a été dilué selon le protocole de dosage correspondant au facteur d'intérêt puis dosé en duplicata. Suite au dosage de l'ensemble des échantillons « Ref » des facteurs II, VII, IX et X, des tests statistiques ont été effectués pour évaluer la distribution des valeurs obtenues, puis déterminer les intervalles de confiance pour chacun des facteurs de coagulation vitamine K dépendant chez le chien. Une évaluation de la distribution des valeurs en fonction du sexe des chiens « Ref » est aussi effectuée pour l'ensemble des facteurs dosés, afin de déterminer si le sexe influence le taux d'activité des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien.

4. Approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien :

Afin de réaliser une première approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien, 6 échantillons issus de la population chiens « AVK », 13 échantillons issus de la population chiens « Lepto » et 7 échantillons issus de la population chiens « IRC » ont été dosés à l'aide des protocoles de dosage mis en place chez le chien lors de la phase de validation des méthodes de dosage des facteurs II, VII, IX et X. Chaque échantillon a été dilué selon le protocole de dosage correspondant au facteur d'intérêt puis dosés en duplicata. Les résultats obtenus ont ensuite été comparés à ceux des échantillons issus de la population chiens « Ref », de manière à évaluer l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien dans des contextes pathologiques.

III. Résultats :

A. Validation des méthodes de dosage des facteurs vitamine K dépendant chez le chien :

1. Linéarité :

i. Résultats de linéarité pour le facteur II :

Le dosage en point final après 5min d'incubation d'une gamme de dilution s'étendant de l'échantillon pur à l'échantillon dilué au 1/100^{ème} a permis d'obtenir pour le facteur II les résultats indiqués dans le tableau II et sur la figure 14 :

Tableau II : Résultats des dosages de la gamme de dilution du facteur II en point final après 5min d'incubation, après adaptation du protocole humain Hyphen Biomed.

Dilutions du plasma citraté CN « Validation »	Absorbance à 405 nm en point final
1	1,244
0,2	0,957
0,04	0,87
0,02	0,853
0,01	0,849
Dilutions du plasma humain	Absorbance à 405 nm en point final
1	1,557

La droite de régression linéaire obtenue à partir des résultats de dosage de la gamme de dilution du facteur II en point final est la suivante :

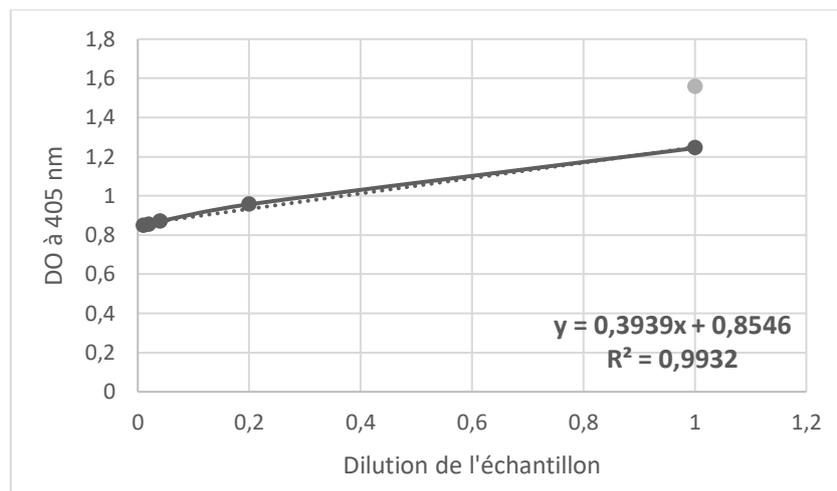


Figure 14 : Droite de régression linéaire à partir des résultats du dosage du facteur II en point final.

Il apparaît que la linéarité est très satisfaisante pour le dosage en point final du facteur II, le coefficient de détermination étant de 0,9932. Ainsi, pour la suite de la validation des méthodes de dosage, il est décidé de doser le facteur II à partir d'une dilution de l'échantillon de plasma citraté de chien au 1/20^{ème}, après un temps d'incubation de 5min suite à l'ajout de l'ensemble des réactifs, *via* la méthode en point final.

ii. Résultats de linéarité pour le facteur X :

Le dosage en point final après 4min d'incubation d'une gamme de dilution s'étendant de l'échantillon pur à l'échantillon dilué au 1/20^{ème} a permis d'obtenir pour le facteur X les résultats indiqués dans le tableau III et sur la figure 15 :

Tableau III : Résultats des dosages de la gamme de dilution du facteur X en point final après 4min d'incubation, après adaptation du protocole humain Hyphen Biophen.

Dilutions du plasma citraté CN « Validation »	Absorbance à 405nm en point final
1	2,214
0,2	0,651
0,1	0,300
0,05	0,179
Dilution du plasma humain	Absorbance à 405nm en point final
0,1	0,197

La droite de régression linéaire obtenue à partir des résultats de dosage de la gamme de dilution du facteur X en point final est la suivante :

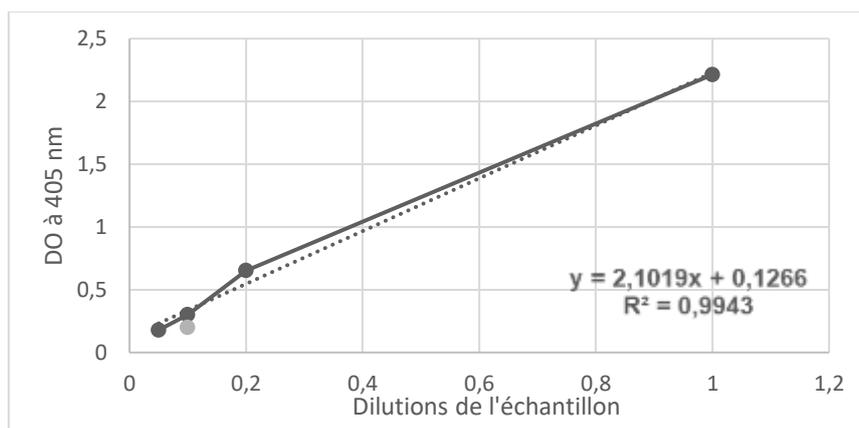


Figure 15 : Droite de régression linéaire à partir des résultats du dosage du facteur X en point final.

Il apparaît que la linéarité est très satisfaisante pour le dosage du facteur X en point final, le coefficient de détermination étant de 0,9943. Ainsi, pour la suite de la validation des méthodes de dosage, il est décidé de doser le facteur X à partir d'une dilution de l'échantillon de plasma citraté de chien au 1/10^{ème}, après un temps d'incubation de 4min suite à l'ajout de l'ensemble des réactifs, *via* la méthode en point final.

iii. Résultats de linéarité pour le facteur VII :

Le dosage de la gamme de dilution (1/800^{ème} au 1/6400^{ème}) du facteur VII a été réalisée en cinétique et en point final. En raison des possibles difficultés d'interactions entre les protéines d'origine humaine et les protéines d'origine canine, il a en effet été jugé intéressant de tester ces deux méthodes de dosage, afin de déterminer laquelle des deux serait la plus linéaire et la plus sensible. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV et sur les figures 16 et 17 :

Tableau IV : Résultats des dosages de la gamme de dilution du facteur VII en cinétique après 9min d'incubation ; et en point final après 4min d'incubation après adaptation du protocole humain Hyphen Biomed.

Dilutions du plasma citraté CN « Validation »	Coefficient directeur (DO/activité relative) à 405nm en cinétique	Absorbance à 405nm en point final
0,0050	0,322	1,285
0,0025	0,313	1,227
0,0013	0,288	1,084
0,0006	0,239	0,869
0,0003	0,173	0,615
0,0002	0,113	0,398
Dilution du plasma humain	Coefficient directeur à 405 nm en cinétique	Absorbance à 405 nm en point final
0,001	0,166	0,570

Les droites de régression linéaire obtenues à partir des résultats de dosage de la gamme de dilution du facteur VII en cinétique sont les suivantes :

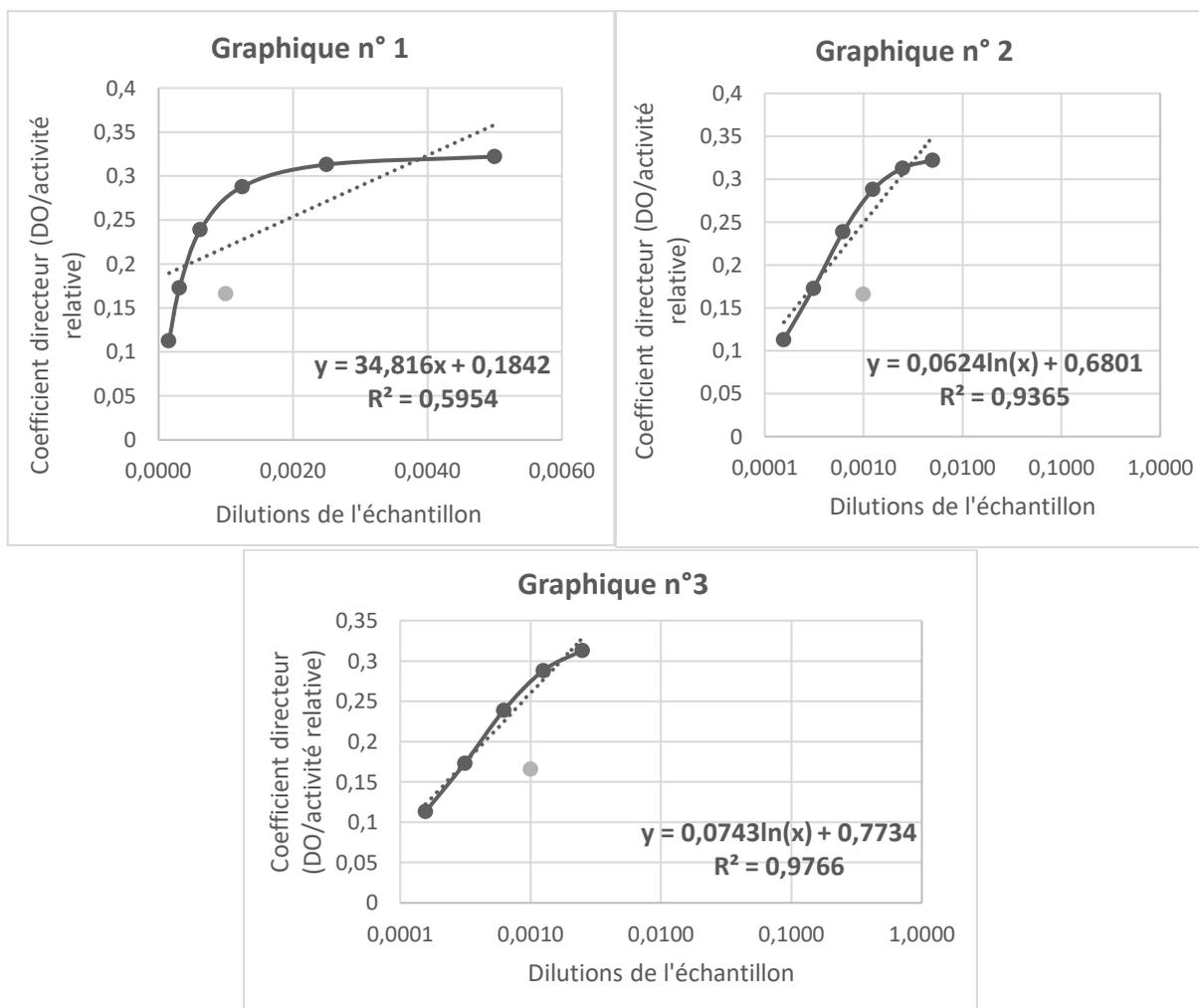


Figure 16 : *Graphique n°1* : droite de régression à partir des résultats du dosage du facteur VII en cinétique ; *Graphique n°2* : droite de régression après modification en variable logarithmique ; *Graphique n°3* : droite de régression en variable logarithmique après suppression de la dilution au 1/200.

Les droites de régression linéaire obtenues à partir des résultats de dosage de la gamme de dilution du facteur VII en point final sont les suivantes :

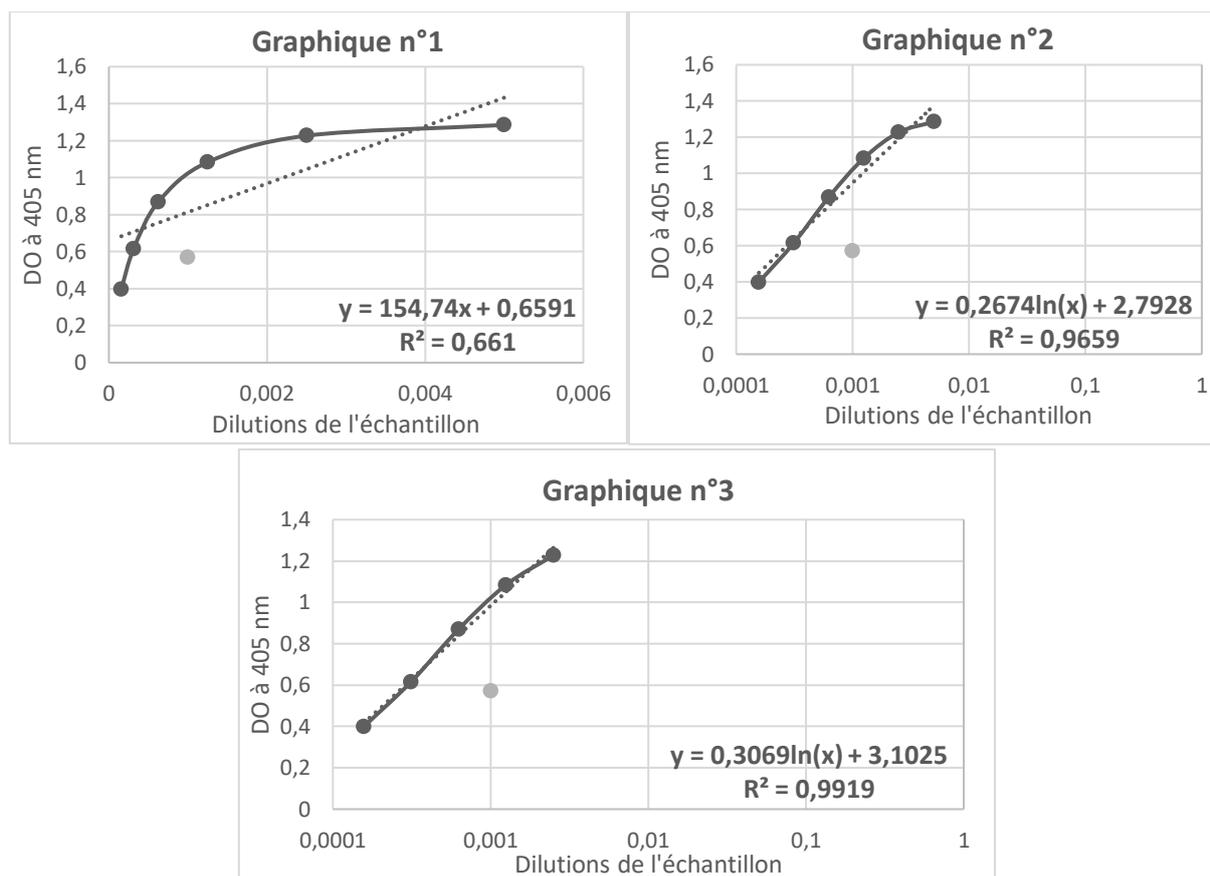


Figure 17 : *Graphique n°1* : droite de régression à partir des résultats du dosage du facteur VII en point final ; *Graphique n°2* : droite de régression après modification en variable logarithmique ; *Graphique n°3* : droite de régression en variable logarithmique après suppression de la dilution au 1/200.

Les « graphiques n°1 » montrent que les dosages en cinétique et en point final ne permettent pas d'obtenir une linéarité convenable de la méthode, avec des coefficients de détermination respectivement de 0.5954 et 0.6610. Ces résultats pourraient s'expliquer par des défauts d'interactions entre les protéines d'origine humaine et les protéines d'origine canine mises en jeu lors des différentes étapes du dosage. Une transformation des variables en échelle logarithmique a donc été réalisée, pour les deux méthodes de dosage. De cette manière, une linéarité est obtenue en cinétique comme en point final, avec des coefficients de détermination variant respectivement de 0,9365 à 0,9766, et de 0,9659 à 0,9919 (selon que le résultat pour la dilution au 1/200 soit conservé ou non). Les résultats ainsi obtenus sont meilleurs dans le cas du dosage en point final, avec également une sensibilité analytique plus grande et un éventail de mesures plus important. La méthode de dosage du facteur VII de la coagulation mise en place chez le chien est donc linéaire en utilisant une transformation logarithmique ; les meilleurs résultats étant obtenus *via* la méthode de dosage en point final.

Ainsi, pour la suite de la validation des méthodes de dosage, il est décidé de doser le facteur VII à partir d'une dilution de l'échantillon de plasma citraté de chien au 1/800^{ème}, après un temps d'incubation de 4min suite à l'ajout de l'ensemble des réactifs *via* la méthode en point final.

iv. Résultats de linéarité pour le facteur IX :

Pour les mêmes raisons que pour le facteur VII, le dosage de la gamme de dilution (1/40^{ème} au 1/640^{ème}) du FIX a été réalisé en méthodes cinétique et point final. Les résultats obtenus lors de la première phase de validation de la méthode de dosage du facteur IX de la coagulation chez le chien sont indiqués dans le tableau V et sur les figures 18 et 19 :

Tableau V : Résultats des dosages de la gamme de dilution du facteur IX en cinétique après 2min d'incubation ; et en point final après 1min d'incubation, après adaptation du protocole humain Hyphen BioMed.

Dilutions du plasma citraté CN « Validation »	Coefficient (DO/activité relative) directeur à 405nm en cinétique	Absorbance à 405nm en point final
0,025	0,504	0,897
0,013	0,412	0,662
0,006	0,273	0,502
0,003	0,195	0,308
0,002	0,118	0,200
0,025	0,504	0,897

Les droites de régression linéaire obtenues à partir des résultats de dosage de la gamme de dilution du facteur IX en cinétique sont les suivantes :

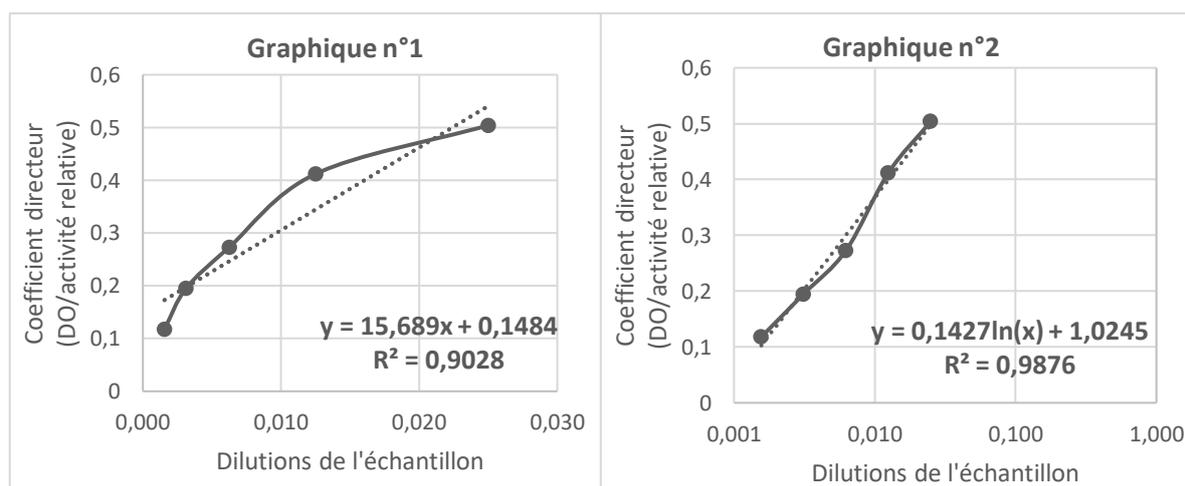


Figure 18 : Graphique n°1 : droite de régression à partir des résultats du dosage du facteur IX en cinétique ; Graphique n°2 : droite de régression après modification en variable logarithmique.

Les droites de régression linéaire obtenues à partir des résultats de dosage de la gamme de dilution du facteur IX en point final sont les suivantes :

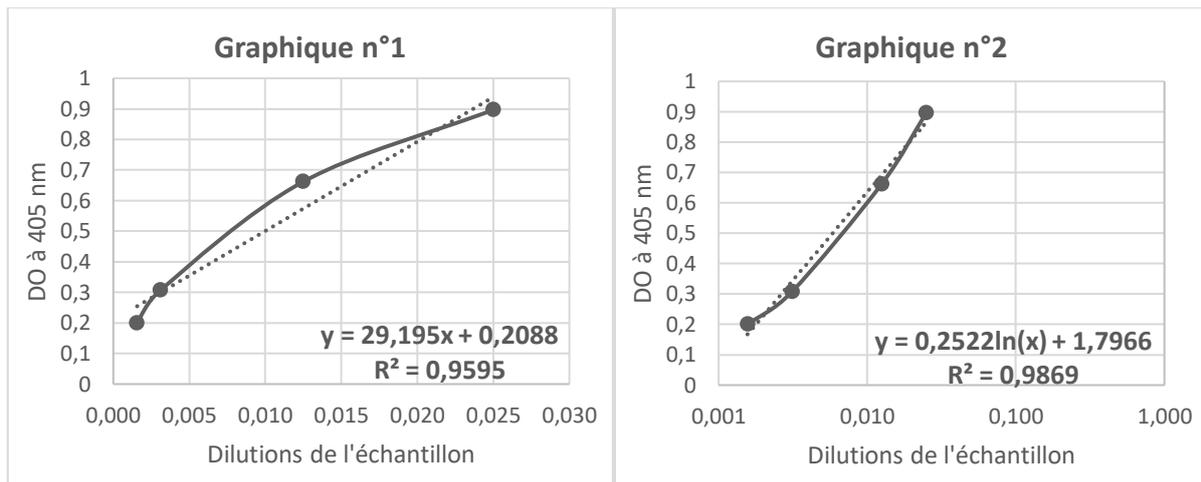


Figure 19 : Graphique n°1 : droite de régression à partir des résultats du dosage du facteur IX en point final ; Graphique n°2 : droite de régression après modification en variable logarithmique.

A l'image des résultats précédemment obtenus pour le facteur VII, les « graphique n°1 » montrent une linéarité peu satisfaisante pour le facteur IX, en cinétique comme en point final, avec des coefficients de détermination respectivement de 0,9028 et 0,9595. Ces résultats de qualité moyenne pourraient avoir la même explication que celle avancée pour le dosage du facteur VII. Une transformation en variables logarithmiques est donc à nouveau réalisée pour les deux méthodes de dosage. Une linéarité est alors obtenue, avec des coefficients de détermination de 0,9876 en cinétique et de 0,9869 en point final.

La méthode de dosage du facteur IX de la coagulation mise en place chez le chien est donc linéaire en utilisant une transformation logarithmique ; les résultats obtenus sont très légèrement meilleurs *via* la méthode de dosage en cinétique.

Ainsi pour la suite de la validation des méthodes de dosage, il est décidé de doser le facteur IX à partir d'une dilution de l'échantillon de plasma citraté de chien au 1/10^{ème}, après un temps d'incubation de 1min suite à l'ajout de l'ensemble des réactifs *via* la méthode en point final (de manière à conserver une méthode de dosage identique à celles utilisées pour l'ensemble des autres facteurs, la différence infime de résultats précédemment citée le permettant).

2. Gammes d'étalonnage :

Les courbes d'étalonnage obtenues pour les facteurs de coagulation vitamine K dépendants après avoir réalisé des gammes d'étalonnage avec le Plasma Calibrator Biophen humain selon les protocoles proposés par Hyphen BioMed, sont présentées sur la figure 20 :

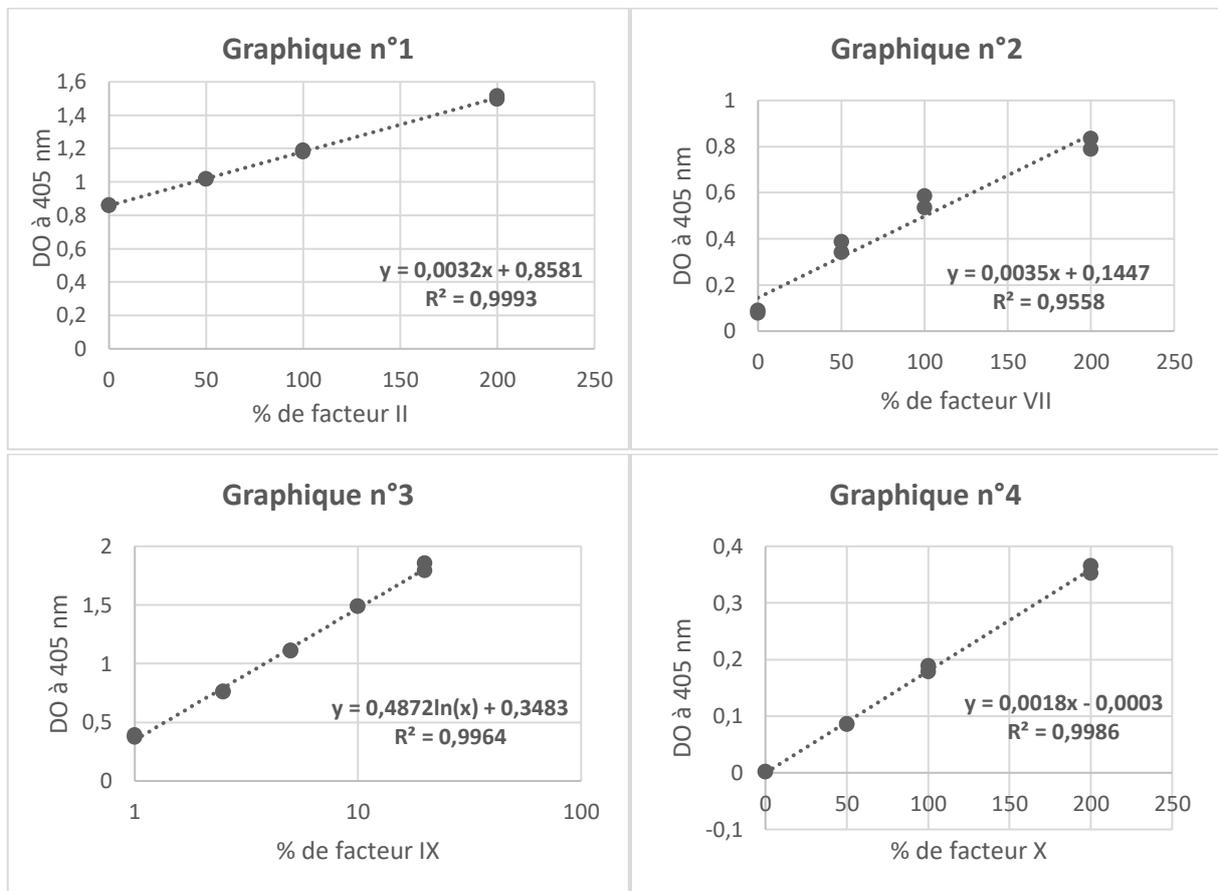


Figure 20 : Graphique n°1 : courbe d'étalonnage du facteur II ; Graphique n°2 : courbe d'étalonnage du facteur VII ; Graphique n°3 : courbe d'étalonnage du facteur IX ; Graphique n°4 : courbe d'étalonnage du facteur X.

Grâce aux résultats de dosage aux dilutions définies précédemment des 25 échantillons de plasmas citratés de chiens « Validation », les équivalences d'activité entre les facteurs chez le chien et les facteurs chez l'homme sont telles que :

- Pour le facteur II : il est déterminé que l'activité moyenne du facteur II chez le chien représente 82,18% de l'activité du facteur II chez l'homme. Ainsi, les résultats de dosage du facteur II chez le chien à la dilution de 1/20^{ème} peuvent être contrôlés par notre gamme étalon humaine. La dilution de dosage précitée est donc validée.
- Pour le facteur VII : il est déterminé que l'activité moyenne du facteur VII chez le chien représente 241,63% de l'activité du facteur VII chez l'homme. Ainsi, les résultats de dosage du facteur VII chez le chien à la dilution de 1/800^{ème} ne peuvent être contrôlés par notre gamme étalon humaine, car ils sont dans les valeurs hautes de la courbe d'étalonnage voire en dehors. La dilution de dosage précitée a donc été modifiée : une dilution au 1/1000^{ème} est utilisée par la suite.
- Pour le facteur IX : il est déterminé que l'activité moyenne du facteur IX chez le chien représente 48,43% de l'activité du facteur IX chez l'homme. Ainsi, les résultats de dosage du facteur IX chez le chien à la dilution de 1/10^{ème} ne peuvent être convenablement contrôlés par notre gamme étalon humaine, car ils sont dans les valeurs basses de la courbe d'étalonnage. La dilution de dosage précitée a donc été modifiée : une dilution au 1/5^{ème} est utilisée par la suite.

- Pour le facteur X : il est déterminé que l'activité moyenne du facteur II chez le chien représente 135,08% de l'activité du facteur X chez l'homme. Ainsi, les résultats de dosage du facteur X chez le chien à la dilution de 1/10^{ème} peuvent être contrôlés par notre gamme étalon humaine. La dilution de dosage précitée est donc validée.

3. Reproductibilité :

Les résultats obtenus lors de l'étude de reproductibilité des dosages des facteurs II, VII et X à partir de 5 échantillons issus de la population chiens « Validation » sont présentés dans le tableau VI :

Tableau VI : Reproductibilité des dosages de 5 échantillons de chiens « Validation », pour les facteurs II, VII et X.

	Validation-006	Validation-007	Validation-008	Validation-009	Validation-010	Moyenne CV (%)
Facteur II						
Moyenne (% Humain)	114,90	116,81	151,93	138,38	195,43	
SD	7,82	3,51	3,93	16,99	111,80	
CV (%)	6,81	3,00	2,59	12,28	57,21	16,38/6,17*
Facteur VII						
Moyenne (% Humain)	239,80	223,04	218,37	88,37	154,51	
SD	9,40	0,82	2,00	5,25	5,86	
CV (%)	3,92	0,37	0,92	5,94	3,79	2,99
Facteur X						
Moyenne (% Humain)	238,11	197,01	240,34	220,26	231,50	
SD	8,57	5,01	3,11	13,56	3,70	
CV (%)	3,60	2,54	1,29	6,16	1,60	3,04

*La première valeur chiffrée correspond à la moyenne des CV calculée en prenant en compte la valeur extrême du chien « Validation-010 » ; la seconde correspond à la moyenne des CV calculée sans prendre en compte la valeur extrême du chien « Validation-010 ».

Les coefficients de variation varient en moyenne entre 2,99 % et 16,38 %. Il semblerait que la méthode de dosage du facteur II présente une précision plus faible (CV = 16,38 % avec conservation de la valeur extrême du chien « Validation-010 » ; 6,17 % sans cette valeur) comparée à celles des facteurs VII et X. On notera qu'un écueil analytique a pu être rencontré, sans être identifié, durant le dosage du facteur II pour le chien « Validation-010 ». Toutefois, un coefficient de variation de 10 à 15% étant généralement accepté, on considère que les méthodes de dosage définies plus tôt sont reproductibles chez le chien, pour les facteurs testés.

Le test de reproductibilité n'a pas été réalisé pour le facteur IX. Un complément de dosage est actuellement en cours pour déterminer si la méthode de dosage du facteur IX est elle aussi reproductible.

4. Stabilité des facteurs au sein du plasma et effets des conditions de conservation :

Les résultats obtenus lors de l'étude de stabilité des facteurs de coagulation vitamine K dépendants au sein du plasma citraté de chien avec influence des conditions de conservation sont présentés dans les tableaux VIII et IX :

Tableau VII : Stabilité des facteurs II, VII et X au sein du plasma citraté de chien après 1^{ère} décongélation puis conservation 5 jours entre 2 et 8 °C.

	Validation-006	Validation-007	Validation-008	Validation-009	Validation-010	Moyenne CV (%)
Facteur II						
Moyenne (% Humain)	116,87	118,39	149,69	129,08	130,98	
SD	9,96	3,09	0,83	7,61	8,58	
CV (%)	2,21	0,68	0,13	1,48	1,64	1,23
Facteur VII						
Moyenne (% Humain)	234,37	223,51	219,51	92,09	158,66	
SD	0	0	0,40	0,67	0,78	
CV (%)	0	0	0,18	0,73	0,49	0,28
Facteur X						
Moyenne (% Humain)	234,95	194,16	240,63	214,14	229,52	
SD	9,31	1,18	4,33	11,96	1,91	
CV (%)	3,96	0,61	1,80	5,58	0,83	12,78

Concernant la stabilité des facteurs dosés après une 1^{ère} décongélation puis une conservation entre 2 et 8°C pendant 5 jours, les coefficients de variation moyens varient de 0,28 à 12,78%. Un coefficient de variation de 10 à 15% étant généralement accepté, on considère que les facteurs II, VII et X présentent une stabilité satisfaisante dans ces conditions. On notera malgré tout que le facteur VII présente une meilleure stabilité au sein du plasma citraté de chien dans les conditions définies que le facteur II, lui-même présentant une meilleure stabilité que le facteur X. La stabilité du facteur IX n'a pas été testée dans ces conditions de conservation.

Tableau VIII : Stabilité du facteur VII au sein du plasma citraté de chien après un cycle de 1^{ère} décongélation-recongélation-2^{ème} décongélation.

	Validation-011	Validation-012	Validation-013	Validation-014	Validation-015	Moyenne CV (%)
Facteur VII						
Moyenne (% Humain)	239,22	253,75	249,42	252,54	249,41	
SD	14,89	8,90	37,27	25,79	32,00	
CV (%)	6,22	3,51	14,94	10,21	12,83	9,54

Concernant la stabilité du facteur VII au sein du plasma citraté de chien après un cycle de 1^{ère} décongélation-recongélation-2^{ème} décongélation, le coefficient de variation moyen est égal à 9,54%. Un coefficient de variation de 10 à 15% étant généralement accepté, on pourrait considérer que le facteur VII présente une stabilité satisfaisante dans les conditions définies. Toutefois, en comparaison des résultats obtenus pour les conditions de conservation entre 2 et 8°C (tableau VIII), il apparaît que la stabilité est non négligemment impactée lorsque le plasma citraté de chien est soumis à un cycle de décongélation-recongélation-décongélation. La stabilité des facteurs II, IX et X n'a pas été testée dans ces conditions de conservation.

5. Répétabilité :

Les résultats obtenus lors de l'étude de répétabilité des dosages des différents facteurs de coagulation vitamine K dépendants à partir d'un échantillon issu de la population chiens « sains » sont présentés dans le tableau IX :

Tableau IX : Résultats du test de répétabilité du dosage d'un échantillon de chien « Sains », pour le facteur X.

Facteur X	Validation-001
Moyenne (% Humain)	160,50
SD	13,83
CV (%)	8,61

Le coefficient de variation du test de répétabilité appliqué au facteur X est de 8,61%. Un coefficient de variation de 10 à 15% étant généralement accepté, on considère que la méthode de dosage du facteur X est répétable chez le chien. Les tests de répétabilité n'ont pas été réalisés pour les facteurs II, VII et IX. Un complément de dosage est actuellement en cours pour déterminer si les méthodes de dosage de ces facteurs sont également répétables.

6. Protocoles de dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants validés chez le chien :

i. Protocole de dosage du facteur II :

Ainsi, après validation, le protocole de dosage du facteur II de la coagulation chez le chien est tel que (tab. X et XI) :

- Préparation des réactifs :

Tableau X : Protocole de préparation des réactifs utilisés lors du dosage du facteur II de la coagulation chez le chien.

PT1 : venin de serpent <i>Echis carinatus</i> dilué au 1/100^{ème}	50µL de venin de serpent <i>Echis carinatus</i> + 5mL de tampon facteur X dilué au 1/10 ^{ème}
PT2 : substrat chromogénique spécifique de la thrombine (BIOPHEN CS-01(38)) à la concentration de 5mg/mL	25mg de substrat chromogénique spécifique de la thrombine + 5mL d'eau distillée

On notera, qu'une fois reconstitué, le réactif PT2 se conserve 7 jours à température ambiante et 3 mois entre 2 et 8°C. Il ne peut être congelé.

- Préparation des plasmas citratés de chien :

Diluer chaque plasma citraté de chien à doser au 1/20 ^{ème} .
--

- Mode opératoire :

Tableau XI : Mode opératoire du protocole de dosage en point d'arrêt du facteur II de la coagulation.

PT1	162µL
Echantillon dilué au 1/20^{ème}	5µL
Incubation	37°C pendant 5min
PT2	10µL
Incubation	37°C pendant 5min
Acide acétique 20%	50µL
Mesure	Lecture DO à 405nm

On notera que l'acide acétique est utilisé ici pour mettre fin à la réaction de dosage. Le facteur II de la coagulation est donc dosé par une méthode en point d'arrêt chez le chien.

ii. Protocole de dosage du facteur VII :

Ainsi, après validation, le protocole de dosage du facteur VII de la coagulation chez le chien est tel que (tab. XII et XIII) :

- Préparation des réactifs :

Tableau XII : Protocole de préparation des réactifs utilisés lors du dosage du facteur VII de la coagulation chez le chien.

R1 : FX humain	Reconstituer le réactif avec exactement 4mL d'eau distillée + Laisser stabiliser 30min à température ambiante
R2 : Thromboplastine calcique de lapin	Reconstituer le réactif avec exactement 2mL d'eau distillée + Laisser stabiliser 30min à température ambiante
R3 : Substrat chromogène spécifique du facteur X activé (Sxa-11)	Reconstituer le réactif avec exactement 4mL d'eau distillée + Laisser stabiliser 30min à température ambiante
R4 : Tampon Tris-BSA	Réactif prêt à l'emploi, pour réaliser les dilutions des plasmas à doser

On notera qu'une fois reconstitués les réactifs se conservent :

-R1 et R2 : 48h entre 2 et 8°C. Ils ne peuvent pas être congelés.

-R3 : 3 mois entre 2 et 8°C. Il ne peut pas être congelé.

- Préparation des plasmas citratés de chien :

Diluer chaque plasma citraté de chien à doser au 1/100 ^{ème} .

- Mode opératoire :

Tableau XIII : Mode opératoire du protocole de dosage en point d'arrêt du facteur VII de la coagulation.

R2	30µL
Incubation	37°C pendant 1min
Echantillon dilué au 1/1000^{ème}	30µL
R1	60µL
Incubation	37°C pendant 7min
R3	60µL
Incubation	37°C pendant 4min
Acide acétique 20%	60µL
Mesure	Lecture DO à 405nm

On notera que l'acide acétique est utilisé ici pour mettre fin à la réaction de dosage. Le facteur VII de la coagulation est donc dosé par une méthode en point d'arrêt chez le chien.

iii. Protocole de dosage du facteur IX :

Ainsi, après adaptation du protocole Hyphen BioMed humain, le protocole de dosage du facteur IX de la coagulation chez le chien est tel que (tab. XIV et XV) :

- Préparation des réactifs :

Tableau XIV : Protocole de préparation des réactifs utilisés lors du dosage du facteur IX de la coagulation chez le chien.

R1 : Facteur X humain + Facteur VIII:C	Reconstituer avec exactement 2,5mL d'eau distillée + Laisser stabiliser 30min à température ambiante
R2 : facteur XI activé + thrombine + calcium + phospholipides	Reconstituer avec exactement 2,5mL d'eau distillée + Laisser stabiliser 30min à température ambiante
R3 : SXa-11	Reconstituer avec exactement 2,5mL d'eau distillée + Laisser stabiliser 30min à température ambiante
R4 : Tampon Tris-BSA	Réactif prêt à l'emploi, pour réaliser les dilutions des plasmas à doser

On notera qu'une fois reconstitués les réactifs se conservent :

-R1 et R2 : 24h entre 2 et 8°C ; 2 mois à -20°C au moins.

-R3 : 1 mois entre 2 et 8°C ; 2 mois à -20°C au moins.

- Préparation des plasmas citratés de chien :

Diluer chaque plasma citraté de chien à doser au 1/5 ^{ème} .

- Mode opératoire :

Tableau XV : Mode opératoire du protocole de dosage en point d'arrêt du facteur IX de la coagulation.

R1	30µL
Echantillon dilué au 1/5 ^{ème}	30µL
R2	30µL
Incubation	37°C pendant 3min
R3	30µL (pré-incubation à 37°C)
Incubation	37°C pendant 1min
Acide acétique 20%	50µL
Mesure	Lecture DO à 405nm

On notera que l'acide acétique est utilisé ici pour mettre fin à la réaction de dosage. Le facteur IX de la coagulation est donc dosé par une méthode en point d'arrêt chez le chien.

iv. Protocole de dosage du facteur X :

Ainsi, après validation, le protocole de dosage du facteur X de la coagulation chez le chien est tel que :

- Préparation des réactifs :

Tableau XVI : Protocole de préparation des réactifs utilisés lors du dosage du facteur X de la coagulation chez le chien.

R1 : SXa-11	Reconstituer avec exactement 2,5mL d'eau distillée + Laisser stabiliser 30min à température ambiante
R2 : Venin de vipère de Russell	Reconstituer avec exactement 2,5mL d'eau distillée + Laisser stabiliser 30min à température ambiante
R3 : Tampon Tris-NaCl	Prêt à l'emploi, pour réaliser les dilutions des plasmas à doser

On notera qu'une fois reconstitués les réactifs se conservent :

-R1 : 1 mois entre 2 et 8°C ; 1 mois à -20°C au moins.

-R2 : 1 semaine entre 2 et 8°C ; 1 mois à -20°C au moins.

-R3 : 3 semaines entre 2 et 8°C.

- Préparation des plasmas citratés de chien :

Diluer chaque plasma citraté de chien à doser au 1/10^{ème}.

- Mode opératoire :

Tableau XVII : Mode opératoire du protocole de dosage en point d'arrêt du facteur X de la coagulation.

Echantillon dilué au 1/10^{ème}	35µL
Incubation	37°C pendant 1min
R1	35µL
Incubation	37°C pendant 2min
R2	35µL
Incubation	37°C pendant 4min
Mesure	Lecture DO à 405nm

On notera que le réactif R2 est utilisé ici pour mettre fin à la réaction de dosage. Le facteur X de la coagulation est donc dosé par une méthode en point d'arrêt chez le chien.

B. Etablissement des valeurs de référence chez le chien :

1. La population de chiens « Ref » étudiée :

Au total, cette étude a permis de recueillir 119 échantillons sanguins de chiens « Ref » sains au regard des résultats des analyses hémato-biochimiques effectuées. Parmi eux, 10 ont dû être exclus de l'étude en raison de la quantité insuffisante de sang prélevé pour mener à bien l'ensemble des dosages des quatre facteurs de coagulation vitamine K dépendants ou de la présence de caillots sanguins dans les tubes de prélèvement. Ainsi, les dosages pour l'établissement des valeurs de référence chez le chien ont été réalisés à partir de 109 échantillons sanguins de chiens « Ref » sains.

D'un point de vu statistiques, les caractéristiques de sexe, âge et poids de cette population sont telles que :

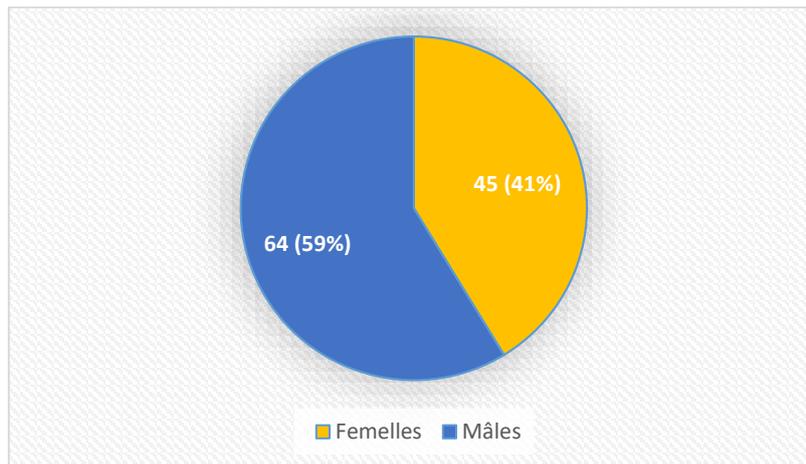


Figure 21 : Répartition de la population des chiens « Ref » en fonction du sexe.

Parmi les 109 chiens « Ref », on retrouve 45 femelles et 64 mâles, soit une proportion de 41,28% de femelles pour 58,72% de mâles.

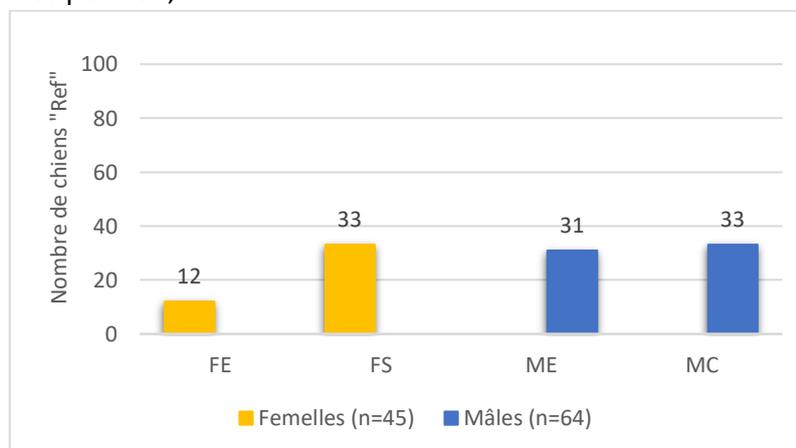


Figure 22 : Répartition des individus stérilisés ou entiers, en fonction du sexe ; FE = Femelles Entières, FS = Femelles stérilisées, ME = Mâles Entiers, MC = Mâles Castrés.

Parmi les chiens « Ref » femelles, 33 sont stérilisées soit 73,33%, ce qui représente 30,28% de la population totale ; et 12 sont entières soit 26,67%, ce qui représente 11,01% de la population totale.

Parmi les chiens « Ref » mâles, 33 sont castrés soit 51,56%, ce qui représente 30,28% de la population totale ; et 31 sont entiers soit 48,44%, ce qui représente 28,44% de la population totale.

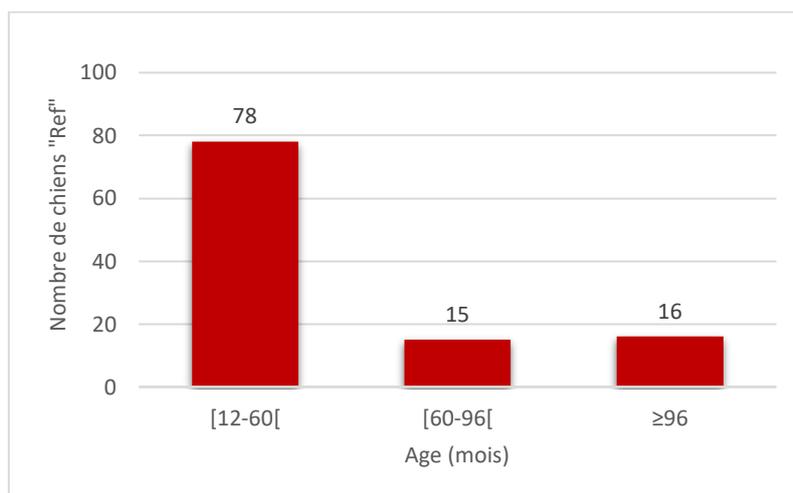


Figure 23 : Répartition de la population des chiens « Ref » en fonction de l'âge.

Afin de répartir la population des chiens « Ref » en fonction de l'âge, il a été décidé de créer 3 classes d'âges : les chiens âgés de 12 à 59 mois, les chiens âgés de 60 à 95 mois et les chiens âgés de 96 mois ou plus. Ainsi, on retrouve 78 chiens soit 71,56% de la population totale dans la première classe d'âge ; 15 chiens dans la seconde, soit 13,76% de la population totale ; et 16 chiens dans la dernière classe d'âge, soit 14,68% de la population totale.

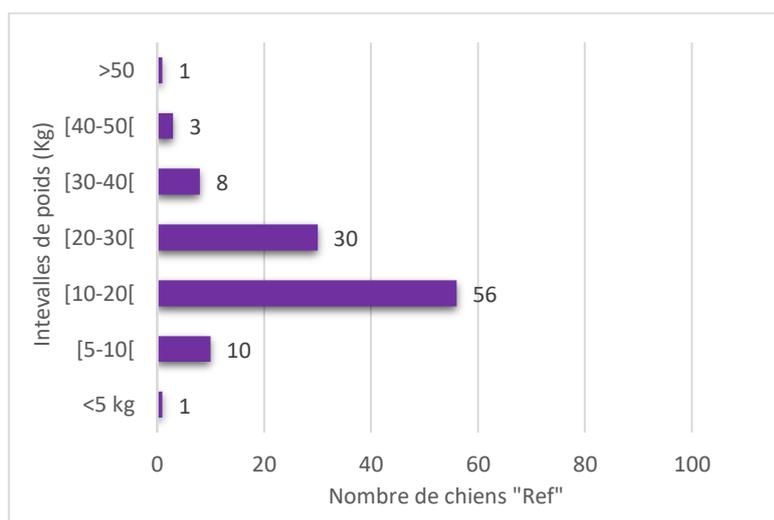


Figure 24 : Répartition de la population des chiens « Ref » en fonction du poids.

Afin de répartir la population des chiens « Ref » en fonction du poids, il a été décidé de créer 7 intervalles de poids différents : les chiens pesant moins de 5 kg ; entre 5 et moins de 10 kg ; entre 10 et moins de 20 kg ; entre 20 et moins de 30 kg ; entre 30 et moins de 40 kg ; entre 40 et moins de 50 kg ; et plus de 50 kg.

Ainsi, on peut constater que la majorité des chiens « Ref » prélevés ont des poids compris entre 10 et 20 kg (56 chiens soit 51,38% de la population totale), puis entre 20 et 30 kg (30 chiens soit 27,52% de la population totale).

Les intervalles de poids extrêmes, moins de 5 kg et plus de 50 kg, regroupent chacun 1 chien soit 0,92% de la population totale. Le reste des chiens « Ref » est réparti comme indiqué sur la figure 24 : soit 9,17% de la population totale entre 5 et moins de 10 kg, 7,34% entre 30 et moins de 40 kg, et 2,75% entre 40 et moins de 50 kg.

En ce qui concerne les races rencontrées au sein de ces différentes catégories de poids, on retrouve :

- Pour les chiens de moins de 10 kg : Spitz, Jack Russel Terrier, Parson Russel, Beagle, et chiens croisés.
- Pour les chiens de 10 à moins de 20 kg : Border Collie, Berger Australien, Beagle, Bulldog, Cocker Anglais, Setter, Basset Fauve de Bretagne, et chiens croisés.
- Pour les chiens de 20 à moins de 30 kg : Labrador, Golden Retriever, Dalmatien, Berger Hollandais, Boxer, Braque de Weimar, Beauceron, Epagneul, Berger Australien, et chiens croisés.
- Pour les chiens de plus de 30 kg : Beauceron, Doberman, Akita Inu, Labrador, Dogue Allemand, et chiens croisés.

2. Analyses statistiques des résultats de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants pour la population de chiens « Ref » :

Le dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants à partir des 109 échantillons issus de la population « Ref » de référence a permis d'obtenir les résultats présentés sur la figure 26 :

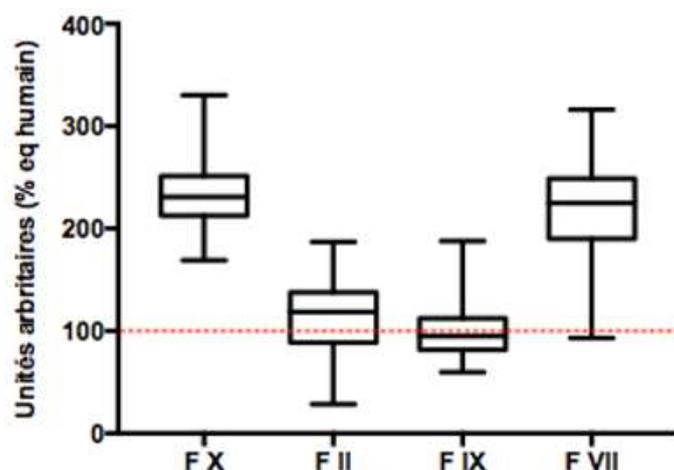


Figure 25 : Distribution des valeurs de dosage des facteurs II, VII, IX, et X de la population « Ref ».

Les analyses statistiques menées sur les résultats de dosages des facteurs II, VII, IX et X au sein de la population chiens « Ref » de référence, nous donne des valeurs moyennes de taux d'activité équivalent humain de : 114,2% pour le facteur II ; 219,3% pour le facteur VII ; 99,47% pour le facteur IX et 232,9% pour le facteur X.

Des tests de normalité d'Agostino et Pearson ont été réalisés pour déterminer si les distributions des valeurs de dosage des facteurs vitamine K dépendants étaient normales (Gaussiennes) ou non. Les résultats des p-values obtenues sont de 0,5555 pour le facteur II ; 0,4002 pour le facteur VII ; inférieure à 0,0001 pour le facteur IX et 0,0611 pour le facteur X.

Il apparait que seule la p-value obtenue pour le facteur IX est inférieure à 0,05. Ainsi, on peut en conclure que la distribution des valeurs mesurées pour les facteurs II, VII et X est normale, ce qui n'est pas le cas pour le facteur IX.

Des tests paramétriques ont ainsi été utilisés, au vu du nombre total de chiens présents dans la population « Ref », pour déterminer les valeurs de référence de chacun des facteurs de coagulation vitamine K dépendants. Les intervalles de confiance à 95 % autour de la moyenne sont les suivants :

- [108,4-120] pour le facteur II ;
- [211,3-227,3] pour le facteur VII ;
- [94,88-104] pour le facteur IX ;
- [227,3-238,4] pour le facteur X.

Quant aux intervalles [Percentile 1%-Percentile 99%] obtenus pour chacun des facteurs dosés, ils sont de :

- [29,29-186,60] pour le facteur II ;
- [95,10-314,6] pour le facteur VII ;
- [60,26-187,60] pour le facteur IX ;
- [169,7-328] pour le facteur X.

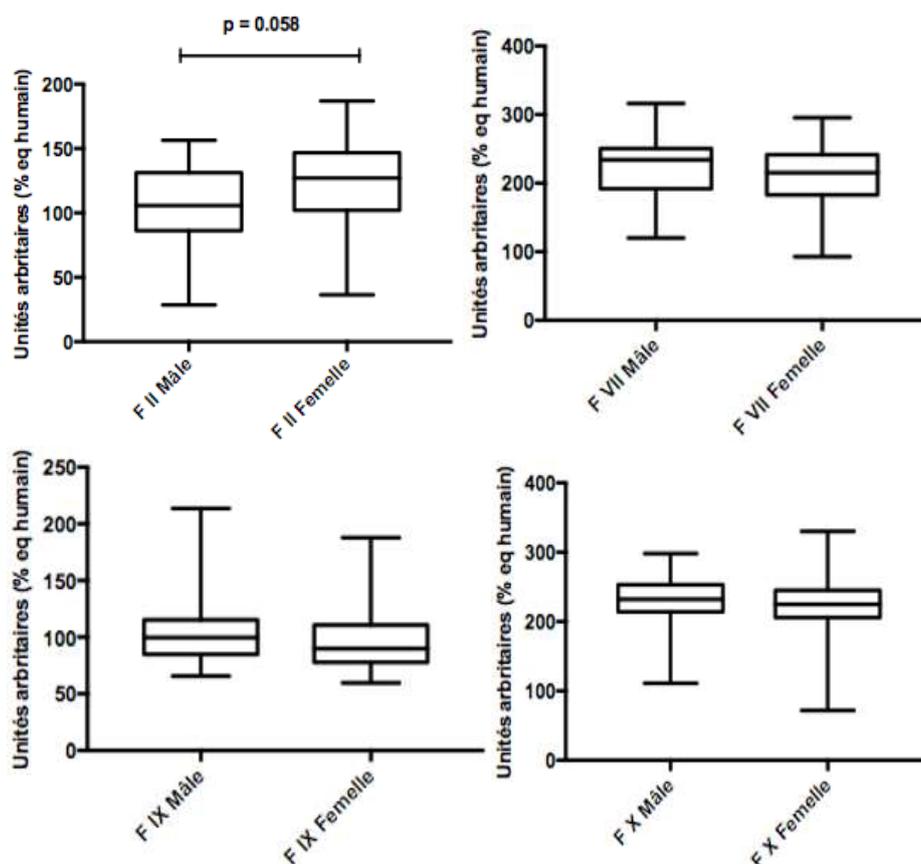


Figure 26 : Distribution des valeurs de dosage des facteurs II, VII, IX, et X de la population de référence « Ref » en fonction du sexe.

Un test t de Student non apparié (étude statistique comparative) a été réalisé pour déterminer s'il existe une différence significative entre les valeurs de dosage obtenues chez les mâles et chez les femelles et ce pour chacun des facteurs de coagulation vitamine K dépendant.

Les résultats de p-value obtenus sont les suivants : 0,0058 pour le facteur II ; 0,1509 pour le facteur VII ; 0,2191 pour le facteur IX ; et 0,2095 pour le facteur X. Ainsi, il apparaît que seule la p-value obtenue pour le facteur II est inférieure à 0,05 : les taux d'activité du facteur II sont donc significativement différents entre les chiens femelles et les chiens mâles.

C. Approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien :

1. Dosages des échantillons issus de la population chiens « AVK » :

Suite au dosage des échantillons issus de la population des chiens intoxiqués « AVK », les résultats obtenus pour chacun des facteurs de coagulation sont présentés sur les figures 28 et 29 :

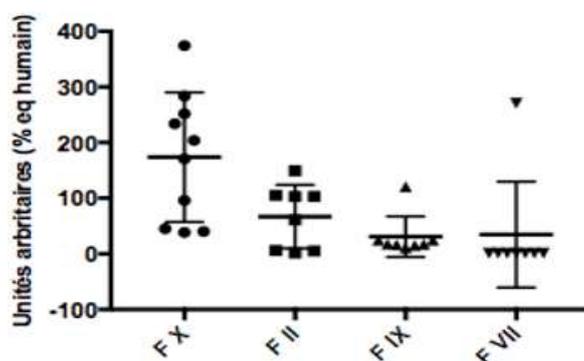


Figure 27 : Distribution des valeurs de dosage obtenus pour les facteurs II, VII, IX et X à partir des échantillons issus de la population de chiens intoxiqués « AVK ».

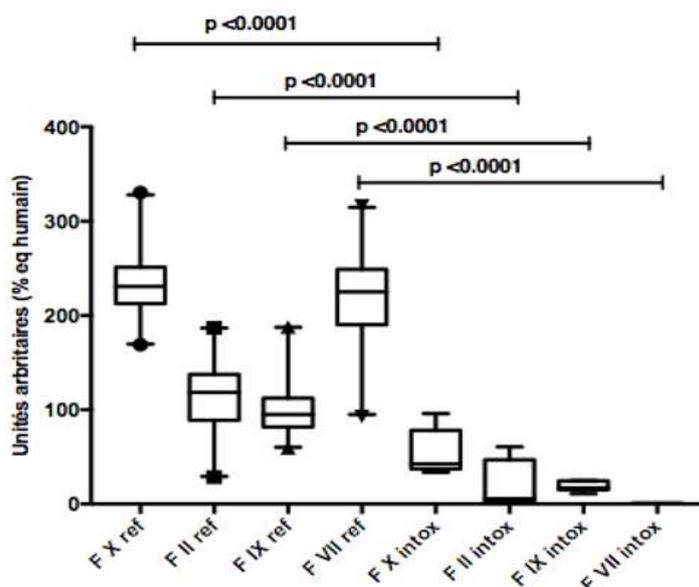


Figure 28 : Comparaison des distributions des valeurs de dosage des facteurs II, VII, IX, et X de la population des chiens « Ref » et de la population des chiens intoxiqués « AVK ».

Il apparaît que la répartition des valeurs de dosage obtenues pour les différents facteurs de coagulation vitamine K dépendants est homogène au sein de la population de chiens intoxiqués « AVK », bien qu'un échantillon (issu du même chien) semble dans les valeurs extrêmes hautes pour chacun des facteurs dosés.

Les résultats des dosages des échantillons de chiens intoxiqués « AVK » mettent en évidence une diminution de l'activité des facteurs de la coagulation vitamine K dépendants avec : 18,37% d'activité résiduelle pour le facteur II, 0% d'activité résiduelle pour le facteur VII, 18,16% d'activité résiduelle pour le facteur IX et 54,28% d'activité résiduelle pour le facteur X. Il y a donc une différence notable en comparaison de l'activité dosée pour chacun des facteurs au sein de la population de chiens « Ref » de référence. Une étude statistique comparative a été menée afin de déterminer si les différences observées entre les valeurs des chiens « Ref » de la population de référence et des chiens intoxiqués « AVK » sont significatives. Les résultats de p-value obtenus sont pour l'ensemble des facteurs II, VII, IX et X inférieurs à 0,0001, soit tous inférieurs à 0,05. Les taux d'activité des facteurs II, VII, IX et X sont donc significativement différents entre les chiens « Ref » sains et les chiens intoxiqués « AVK ».

2. Dosages des échantillons issus des populations chiens « Lepto » et « IRC » :

Suite au dosage des échantillons issus des populations de chiens « Lepto » et « IRC », les résultats obtenus pour les facteurs de coagulation VII et IX sont présentés sur les figures 29 et 30 :

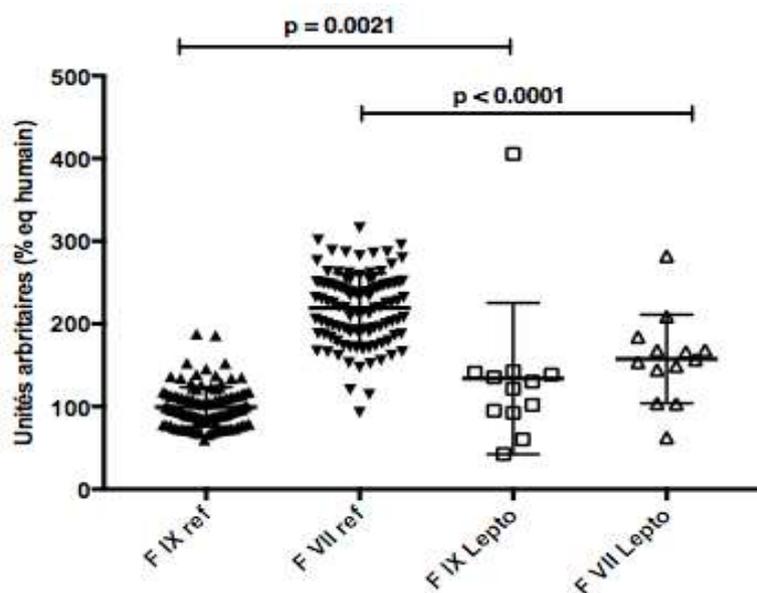


Figure 29 : Comparaison des distributions des valeurs de dosage des facteurs VII et IX de la population des chiens « Ref » de référence et de la population des chiens « Lepto ».

Les analyses statistiques menées à partir des résultats de dosage des échantillons de la population de chiens « Lepto » obtenus pour les facteurs VII et IX montrent des moyennes de taux d'activité équivalent humain de 157,6% pour le facteur VII et 134% pour le facteur IX. Ainsi, il apparaît que l'activité du facteur VII est plus faible au sein de la population « Lepto » par rapport à celle de la population « Ref » de référence ; et que l'activité du facteur IX est au contraire plus importante.

Une étude statistique comparative a été menée afin de déterminer si ces différences observées par rapport aux résultats obtenus pour la population « Ref » de référence sont significatives ou non. Les valeurs des p-values obtenues sont : inférieure à 0,0001 pour le facteur VII, et 0,0021 pour le facteur IX, soit inférieures à 0,05 pour les deux facteurs dosés. Les taux d'activité des facteurs VII et IX sont donc significativement différents entre les chiens issus de la population « Lepto » et ceux de la population « Ref » de référence.

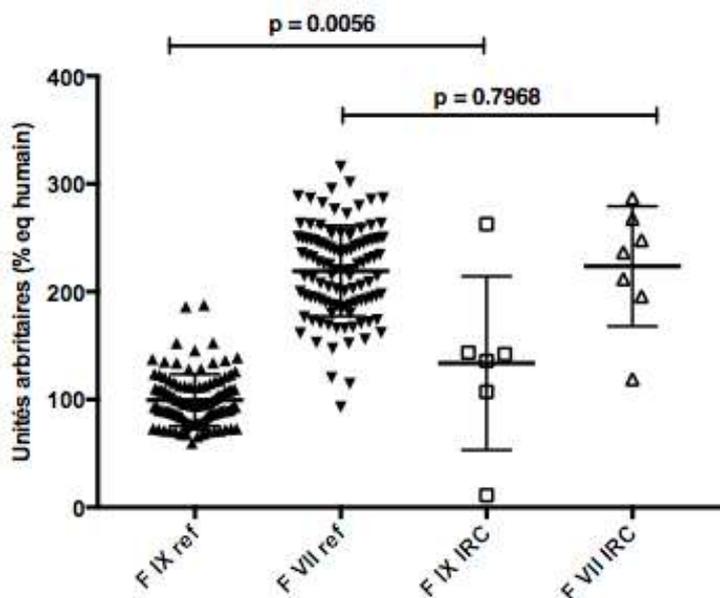


Figure 30 : Comparaison des distributions des valeurs de dosage des facteurs VII et IX de la population des chiens « Ref » de référence et de la population des chiens « IRC ».

Les analyses statistiques menées à partir des résultats de dosage des échantillons de la population de chiens « IRC » obtenus pour les facteurs VII et IX, montrent des moyennes de taux d'activité équivalent humain de 223,6% pour le facteur VII et 133,8% pour le facteur IX. Une étude statistique comparative a été menée afin de déterminer si ces différences observées par rapport aux résultats obtenus pour la population « Ref » de référence sont significatives ou non. Les valeurs des p-values obtenues sont : 0,7968 pour le facteur VII, et 0,0056 pour le facteur IX, soit inférieures à 0,05 uniquement pour le facteur IX. Ainsi, seuls les taux d'activité des facteurs IX sont significativement différents entre les chiens issus de la population « IRC » et ceux de la population « Ref » de référence.

Les dosages des facteurs II et X des populations de chiens « Lepto » et « IRC » ayant rencontré des écueils analytiques, les résultats n'ont pas pu être exploités et ne sont donc pas exposés ici.

IV. Discussion :

A. Validation des méthodes de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien :

A l'issue de ce travail expérimental, il semble dans un premier temps qu'une dichotomie entre deux catégories de facteurs puisse être mise en avant. Il apparaît en effet que la différence entre les réactions de dosage des couples facteur II/X et facteur VII/IX est importante à prendre en compte dans le traitement de nos résultats. Les réactions de dosage des facteurs II et X sont des réactions directes, seul le venin de serpent étant à l'origine de l'activation des facteurs ; contrairement aux réactions de dosage des facteurs VII et IX qui mettent en jeu plusieurs intermédiaires, notamment des protéines recombinantes d'origine humaine et des protéines d'origine canine. Dans ce dernier cas, il semble possible qu'il y ait formation de complexes catalytiques actifs entre ces protéines d'origines différentes. Ces observations pourraient ainsi expliquer les différences de résultats obtenus au cours des phases de validation des méthodes de dosage. Il a été plus difficile par exemple d'obtenir une linéarité pour les facteurs VII et IX, avec nécessité d'une transformation logarithmique des variables, contrairement aux facteurs II et X.

Plus précisément, en ce qui concerne les résultats de linéarité, il apparaît que les méthodes de dosage établies pour les différents facteurs de coagulation sont linéaires, avec des coefficients de détermination variant de 0,9659 (FVII) à 0,9943 (FX). L'obtention de la linéarité a été plus simple et de meilleure qualité pour les facteurs II et X, contrairement à ce qui a été obtenu pour les facteurs VII et IX, pour lesquels une transformation en échelle logarithmique des variables a été nécessaire. La dichotomie mise en avant précédemment pourrait expliquer cette différence de résultats.

La technique de dosage en point final consiste à lancer une réaction avec mise en contact des substrats et des réactifs, puis à l'arrêter après un temps donné avec un réactif d'arrêt (l'acide acétique 20% dans le cas de notre étude) afin de permettre le dosage du produit formé en fin de réaction, à une DO donnée. La technique de dosage en cinétique est une technique de dosage en continu, qui consiste à mesurer au cours du temps la variation d'absorbance à une DO donnée directement en fonction de l'apparition du produit formé au cours de la réaction. Dans notre étude, ces deux techniques ont été testées pendant la validation des méthodes de dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants, en particulier pour les facteurs VII et IX. C'est finalement la technique du dosage en point final qui a été choisie. D'une part parce qu'il est apparu que la sensibilité analytique était meilleure par rapport à la technique de dosage en cinétique ; d'autre part parce que l'éventail de valeurs obtenues dans le cas de la technique en point final était plus étendu que celui de la méthode en cinétique, ce qui permet de prévoir de larges variations du paramètre dosé, notamment dans le cas de dosages d'échantillons pathologiques. Ainsi, l'utilisation de la technique de dosage en point final permet d'obtenir des résultats de meilleure qualité, ce qui peut avoir un intérêt en routine pour la précision des interprétations et des décisions médicales.

En ce qui concerne la validation de la précision de nos méthodes de dosage, l'accent a été porté sur l'évaluation de la reproductibilité des dosages et de la stabilité des échantillons dans des conditions de conservation définies, par rapport à la répétabilité des dosages.

Des contraintes de réalisation existaient, essentiellement en lien avec une instabilité affichée des réactifs fournis par Hyphen BioMed, notamment pour les facteurs VII et IX ; et une possible instabilité des facteurs de coagulation vitamine K dépendants dans le plasma citraté de chien, par exemple après congélation-décongélation puis conservation plusieurs jours entre 2 et 8°C, ou après des cycles de congélation-décongélation-recongélation. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence que les méthodes de dosage développées sont reproductibles, bien que cela reste à confirmer pour le facteur IX. De plus, la stabilité des facteurs II, VII et X est finalement bonne dans le plasma citraté de chien conservé entre 2 et 8°C pendant 5 jours, après un cycle de congélation-décongélation. En revanche, il apparaît qu'il y a une différence non négligeable entre les données issues des premières conditions de conservation et celles issues d'échantillons ayant subi un cycle de congélation-décongélation-recongélation, avec une variation non négligeable de l'activité mesurée entre les deux dosages, en faveur d'un problème de stabilité pour ce facteur durant le cycle (test de stabilité effectué uniquement sur le facteur VII). En conclusion, les échantillons utilisés pour le dosage de facteurs de coagulation peuvent être conservés après une première décongélation entre 2 et 8°C pendant environ 5 jours ; en sachant que, d'après nos résultats, le facteur VII est plus stable que le facteur II, lui-même plus stable que le facteur X. La stabilité du facteur IX dans les conditions de conservation définies et pré-citées reste à déterminer.

Concernant les tests de répétabilité menés au cours de cette étude, ils ont été restreints. D'après les résultats obtenus pour le facteur X, la méthode de dosage développée est répétable. D'autre part, le dosage de chaque facteur en duplicata pour chacun des échantillons issus de la population chiens « Validation » n'a pas mis en évidence de variation aberrante entre les absorbances mesurées pour un même facteur au sein d'un même échantillon. Nos méthodes de dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants semblent donc répétables, bien qu'il soit nécessaire de compléter les tests de répétabilité pour pouvoir l'affirmer.

L'établissement de courbes d'étalonnage à partir d'un plasma de référence humain, a permis de confirmer les dilutions de dosage des échantillons choisies pour chacun des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien ; et d'évaluer la correspondance entre l'activité des facteurs d'origine canine et celle des facteurs d'origine humaine. Il a ainsi été mis en évidence que les résultats de dosage de chaque facteur peuvent être contrôlés à l'aide d'une courbe étalonnage humaine, aux dilutions de dosage définies.

Ainsi, au vu des résultats obtenus au cours des phases de validation des méthodes de dosages des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien, il a été possible d'établir des protocoles définitifs de dosage de chacun des facteurs II, VII, IX et X, par méthode chromogénique, en point final, sur l'automate Konelab 20 Thermo Scientific (ThermoFisher, France). Ces derniers ont ensuite pu être utilisés pour l'établissement d'intervalles de référence des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien.

B. Etablissement de valeurs de référence des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien :

Durant le temps qu'a duré cette étude, 119 chiens ont pu être prélevés pour faire partie de la population chiens « Ref », considérée comme de référence et utilisée pour établir des intervalles de référence des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien. Parmi ces 119 échantillons, seuls 109 ont pu être réellement dosés. Les 10 exclus l'ont été pour des raisons de quantité de plasma insuffisante pour la réalisation de l'ensemble des dosages prévus.

L'étude de la distribution puis de la normalité des activités obtenues, pour chacun des facteurs de la coagulation vitamine K dépendant dosés, a permis de montrer que seuls les résultats du facteur IX ne répondaient pas à une loi normale. Suite à la réalisation de tests paramétriques, des valeurs de références ont pu être déterminées.

Ainsi, l'étude des résultats des dosages dans la population de référence a permis dans un premier temps de mettre en évidence l'existence de niveaux d'activité différents des facteurs de coagulation vitamine K dépendants au sein de l'espèce canine. En effet, étant donné les différences de dilution auxquelles sont dosés chacun des facteurs de coagulation (de 1/5^{ème} à 1/1000^{ème}), des facteurs comme le facteur VII présentent des activités plus fortes que d'autres, comme le facteur IX par exemple.

Dans un deuxième temps, il est apparu, dans notre étude, que les facteurs vitamine K dépendants chez le chien ont un niveau d'activité différent de celui observé chez l'homme. Cette différence peut être d'origine biologique ou méthodologique. Pour les facteurs II et X, au vu de la simplicité des réactions mise en jeu au cours des dosages, c'est-à-dire des réactions directes et donc sans interaction entre les protéines recombinantes humaines et les protéines d'origine canine, une différence d'origine biologique serait l'hypothèse principale. Ce qui signifie qu'au vu des résultats obtenus pour le facteur X, ce dernier pourrait avoir une activité environ deux fois plus rapide et plus importante chez le chien comparé à l'homme.

En ce qui concerne les facteurs IX et VII, il se pourrait que la dichotomie évoquée plus tôt puisse entrer en compte : les réactions mises en jeu au cours du dosage de ces facteurs sont complexes et nécessitent des interactions entre des protéines recombinantes et des protéines d'origine canine. Ainsi, les différences constatées, notamment pour le facteur VII, pourraient s'expliquer davantage dans ce cas par l'hypothèse méthodologique. Toutefois, ce postulat pris en compte, il apparaît que les résultats obtenus pour le facteur IX viennent contredire ce raisonnement : l'activité du facteur IX chez le chien semble en effet quasiment équivalente à 100 % de l'activité de facteur IX humain. Ainsi, soit l'activité du facteur VII chez le chien est environ deux fois plus rapide et importante que celle observée chez l'homme ; soit les différences constatées proviennent de la méthodologie de dosage elle-même.

Enfin, en réalisant une étude comparative des résultats de la population « Ref » de référence en fonction du sexe, il est apparu une différence significative entre les chiens mâles et les chiens femelles pour le facteur II, avec une activité plus importante chez les femelles que chez les mâles. Ce résultat rejoint ceux déjà constatés chez l'homme. (79)

Toutefois, en ce qui concerne les facteurs VII, IX et X, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les chiens mâles et femelles, ce qui diffère de ce qui est observé chez l'homme ou le rat : chez le rat, les femelles présentent une activité plus importante des facteurs VII et IX ; chez l'Homme, les femmes présentent une activité plus importante pour l'ensemble des facteurs de coagulation vitamine K dépendants ainsi que pour les facteurs XI et XII. (79), (80) Ces différences seront donc à prendre en compte dans l'interprétation des résultats de dosage chez le chien si une utilisation en routine doit être envisagée.

C. Approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants :

Afin de réaliser une première approche de l'intérêt clinique du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien, ont été évalués des échantillons issus de chiens présentant un statut pathologique pouvant avoir des conséquences sur l'activité des facteurs de coagulation vitamine K dépendants : intoxications avérées aux AVK, leptospirose et IRC.

Les résultats obtenus dans la population de chiens intoxiqués « AVK » ont permis tout d'abord de constater que les méthodes de dosage développées au cours de cette étude permettaient bel et bien de doser des facteurs de coagulation vitamine K dépendants, et d'obtenir des variations notables des activités mesurées dans un contexte pathologique dont le profil est connu (diminution marquée de l'activité des facteurs dans le cas des intoxications aux AVK). La comparaison des résultats obtenus pour les chiens intoxiqués « AVK » et les chiens « Ref » de référence a en effet mis en évidence des différences significatives, avec une diminution plus ou moins importante de l'activité des facteurs chez les chiens intoxiqués « AVK ».

En ce qui concerne le dosage des échantillons issus des populations de chiens « Lepto » et « IRC », seule l'activité des facteurs VII et IX a pu être évaluée. Des écueils analytiques rencontrés au cours des dosages des facteurs II et X n'ont en effet pas permis d'utiliser les résultats obtenus. Dans ce contexte, des différences significatives ont pu être mises en évidence entre les résultats des chiens « Lepto » et des chiens « IRC » et ceux des chiens « Ref » de référence : pour les deux facteurs pour la population « Lepto » ; uniquement pour le facteur IX pour la population « IRC ». Ainsi, on peut confirmer que les méthodes de dosage développées durant cette étude permettent de mettre en évidence des modifications des paramètres dosés dans des conditions pathologiques. Et que, dans des contextes de maladies débilitantes, des modifications des taux d'activité de certains facteurs de coagulation vitamine K dépendants peuvent être mises en évidence, démontrant le possible intérêt diagnostique de ces dosages en cas d'utilisation en routine : dans un contexte supposé d'état hypercoagulable (chiens « Lepto ») on pourrait par exemple ainsi constater une diminution de l'activité du facteur VII et une augmentation de celle du facteur IX.

D. Elargissement de la discussion et perspectives de travail :

Au regard des résultats obtenus, se pose à présent la question de l'utilisation en routine des méthodes de dosage développées durant ce travail pour les facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien.

Les paramètres qui semblent importants à prendre en compte pour répondre à cette question sont : la pertinence du dosage au sein de cette espèce ; le matériel ; la technicité ; la durée et le coût des dosages ; le choix du ou des facteurs à doser.

En ce qui concerne la pertinence du dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants, il semble que les travaux préliminaires sur les échantillons pathologiques « AVK », « Lepto » et « IRC » permettent d'affirmer que l'intérêt clinique de tels dosages chez le chien est important.

Une perspective de travail pourrait être de doser l'ensemble des facteurs II, VII, IX et X et ce sur des populations malades de taille plus importante pour rechercher une altération de leur activité dans différents contextes pathologiques. Par exemple, dans le cas de la leptospirose, où l'apparition d'un état hypercoagulable est documenté, il pourrait être judicieux de comparer les méthodes diagnostiques actuelles (dosage des PDF et D-Dimères) avec le dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants, de manière à déterminer si ces derniers pourraient permettre un diagnostic plus précoce, et donc avoir un intérêt clinique d'autant plus important. La mesure de l'activité de ces facteurs pourrait également permettre une détection plus précoce d'une déficience en vitamine K dans certaines affections (insuffisance hépatique, maladies des voies biliaires...) que par la mesure du TQ.

Pour ce qui est des contraintes de coût, de faisabilité et de durée des analyses via les méthodes de dosage définies au cours de cette étude, il apparaît qu'elles sont non négligeables. Elles seraient ainsi un frein important à la réalisation de ces dosages en clientèle, bien que ce soit moins le cas pour une utilisation en laboratoire d'analyses médicales.

Pour une utilisation en routine et notamment en clientèle vétérinaire, il faudrait ainsi envisager de faire un choix parmi les facteurs à doser. Les données suivantes sont à considérer : les temps de dosage des facteurs VII et IX sont plus longs que ceux des facteurs II et X, en raison de la complexité plus importante des réactions mises en jeu ; la dilution au 1/1000^{ème} du facteur VII suppose des contraintes techniques et de temps très importantes comparées aux autres facteurs qui se dosent à des dilutions plus faibles ; le temps de conservation des réactifs fournis par le laboratoire Hyphen BioMed est moins long et donc plus contraignant pour les facteurs VII et IX ; les résultats de linéarité sont meilleurs pour les facteurs II et X. Ainsi, il apparaît que pour des raisons de contraintes techniques, de temps et de précision des résultats, le choix s'orienterait davantage vers le dosage en routine des facteurs II et X plutôt que des facteurs VII et IX. Pour un choix en fonction de l'intérêt clinique, leur évaluation dans différents contextes pathologiques tel qu'évoqué précédemment pourrait permettre de déterminer si un facteur de coagulation vitamine K dépendant subit des variations plus importantes ou plus précoces qu'un autre, et pourrait ainsi être choisi comme le facteur à doser en priorité.

CONCLUSION

L'étude expérimentale menée au cours de ce travail de thèse a permis de développer et valider une méthode de dosage chromogénique sur automate des facteurs de coagulation vitamine K dépendants chez le chien, ainsi que de déterminer des intervalles de référence pour ces paramètres dans cette espèce. La méthode de dosage testée s'est révélée fiable et linéaire, avec des résultats de qualité supérieure pour les facteurs II et X.

Les variations de ces paramètres sanguins ont aussi pu être évaluées en intra espèce et en inter espèce en comparaison avec l'homme. Des différences significatives ont ainsi pu être observées : différence d'activité entre les différents facteurs au sein de l'espèce canine ; niveau d'activité plus important chez la chienne ; différence de niveau d'activité de certains facteurs comparé à l'homme.

Enfin, une première approche de l'intérêt clinique de ces dosages chez le chien a été réalisée en comparant les résultats obtenus chez des chiens sains de référence et des chiens malades (intoxiqués aux AVK, souffrant d'une leptospirose ou d'une IRC). La méthode de dosage développée durant cette étude a permis de mettre en évidence des différences significatives entre des chiens sains et des chiens souffrant de maladies débilitantes connues. Cette méthode peut donc être envisagée comme un futur outil diagnostique des troubles de l'hémostase impliquant les facteurs de coagulation vitamine K dépendants comme des coagulopathies d'origine héréditaire, des états de déficience en vitamine K ou en γ -carboxylation, ou encore des états d'hyper ou d'hypocoagulabilité. Toutefois, des études complémentaires devront être menées pour confirmer cela, notamment en utilisant des populations de chiens malades de taille plus importante.

Une exploration plus fine de l'hémostase chez le chien semble donc maintenant possible en médecine vétérinaire via le dosage des facteurs de coagulation vitamine K dépendants, avec une application envisageable en routine, dans les domaines de la recherche et/ou de la clientèle.

Bibliographie

1. Weiss DJ, Wardrop KJ. Hemostasis : Overview of hemostasis. In: SCHALM'S VETERINARY HEMATOLOGY SIXTH EDITION. Wiley-Blackwell. p. 635-53.
2. Stockham SL, Scott MA. Hemostasis. In: Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology Second Edition. 2008. p. 259-321. (Blackwell publishing).
3. Barthelemy A. Apports de la thromboélastométrie rotative dans l'exploration des désordres de l'hémostase chez le chien: application à la leptospirose. :154.
4. VERDY E. L'hémostase et les tests qui l'explorent. Prog En Urol. 1997;7:320–325.
5. De Revel T, Doghmi K. Physiologie de l'hémostase. EMC-Dent. 2004;1(1):71–81.
6. Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, Fyfe B, Friedrich V, Mendlowitz M, et al. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. [Internet]. 1993 [cité 1 nov 2017]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/116452/pdf>
7. Les mécanismes moléculaires de l'activation plaquettaire [Internet]. [cité 1 nov 2017]. Disponible sur: <http://www.academie-medecine.fr/wp-content/uploads/2014/09/pages-de-361-374.pdf>
8. Bryckaert M, Rosa J-P, Denis CV, Lenting PJ. Of von Willebrand factor and platelets. Cell Mol Life Sci. 2015;72(2):307–326.
9. Fibrinopeptides A and B release in the process of surface fibrin formation [Internet]. [cité 1 nov 2017]. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/117/5/1700.full.pdf>
10. Marguerie G. Le fibrinogène, facteur multifonctionnel de l'hémostase. 1986 [cité 19 mars 2017]; Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/3493>
11. Hall CE, Slayter HS. The Fibrinogen Molecule : its Size, Shape, and Mode of Polymerization. J Cell Biol. 1959;5(1):11–27.
12. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody [Internet]. [cité 1 nov 2017]. Disponible sur: https://ac.els-cdn.com/004938489090034A/1-s2.0-004938489090034A-main.pdf?_tid=616ea28a-bf32-11e7-90ce-00000aacb35d&acdnat=1509561056_66874944fcdeffc77bcd3282455571c8
13. Ternisien C, de Prost D. Le facteur tissulaire : structure, expression normale et pathologique, fonctions et régulation. Hématologie. 1995;1(5):379–84.
14. Mikaelsson ME. The Role of Calcium in Coagulation and Anticoagulation. In: Coagulation and Blood Transfusion [Internet]. Springer, Boston, MA; 1991 [cité 1 nov 2017]. p. 29-37. (Developments in Hematology and Immunology). Disponible sur: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-3900-1_3
15. Eradication of neutralizing antibodies to factor VIII in canine hemophilia A after liver gene therapy [Internet]. [cité 21 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/116/26/5842.full.pdf>
16. Pernod G, Briquel M-E. Déficits en facteur XI : aspects théoriques et pratiques. Sang Thromb Vaiss. 2001;13(3):94–101.

17. Alhenc-Gelas M. Le facteur XIII, polymorphismes génétiques et conséquences fonctionnelles. *Hématologie*. 2000;6(2):131–5.
18. Stenflo J, Fernlund P, Egan W, Roepstorff P. Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc Natl Acad Sci*. 1974;71(7):2730–2733.
19. Siguret V. Vitamine K: métabolisme, éléments de physiopathologie, implication dans la variabilité inter-et intra-individuelle de la réponse au traitement par les antivitamines K. *Hématologie*. 2006;12(6):389–399.
20. Bezeaud A, Vidaud D, Guillin M-C. Les déficits constitutionnels en prothrombine et les informations qu'ils peuvent nous apporter sur la structure et les fonctions de la prothrombine. *Hématologie*. 2005;11(6):397–407.
21. Schevd. Physiologie de l'hémostase. Ressour Pédagogique Numér [Internet]. 1 janv 2007 [cité 30 mai 2017]; Disponible sur: http://www.sup-numerique.gouv.fr/ressources-pedagogiques/notice/view/oai%3Adocumvf.crihan.fr%3Aumvf%2Fmed_univ_montp1_fr_manuel_DOC_17465
22. Nelson RW, Couto CG. Disorders of Hemostasis. In: *SMALL ANIMAL INTERNAL MEDICINE FIFTH EDITION*. ELSEVIER. 2014. p. 1245-63.
23. Korchia J, Deshuillers P. Evaluation de la fonction hémostatique. 4e partie : exploration de l'hémostase par les dosages plasmatiques. 2015;(50):218-20.
24. Wang W, Boffa MB, Bajzar L, Walker JB, Nesheim ME. A Study of the Mechanism of Inhibition of Fibrinolysis by Activated Thrombin-activable Fibrinolysis Inhibitor. *J Biol Chem*. 16 oct 1998;273(42):27176-81.
25. Rapport Hemostase et coagulation Tome 1.pdf [Internet]. [cité 4 nov 2017]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-08/biologie_anomalie_hemostase_t1_temps_de_saignement_-_rapport_devaluation_2011-08-10_14-55-5_340.pdf
26. Stepanian A, Biron-Andréani C. Exploration de l'hémostase primaire. *Ann Biol Clin (Paris)*. 16 nov 2001;59(6):725-35.
27. Jergens AE, Turrentine MA, Kraus KH, Johnson GS. Buccal mucosa bleeding times of healthy dogs and of dogs in various pathologic states, including thrombocytopenia, uremia, and von Willebrand's disease. *Am J Vet Res*. sept 1987;48(9):1337-42.
28. Tessier-Marteau A, Geneviève F, Godon A, Macchi L, Zandecki M. Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 juill 2010;68(4):393-407.
29. Deepti A. J. EAI. Anticoagulant Induced Pseudothrombocytopenia- An Incidental Finding Deepti A. J. 1 , Erli Amel Ivan 2. *Int J Recent Trends Sci Nd Technol*. 2014;9:321-2.
30. Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E. Coagulation Testing. In: *TEXTBOOK OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE EIGHT EDITION*. ELSEVIER. p. 2053-61.
31. Weiss DJ, Wardrop KJ. Laboratory Testing of Coagulation Disorders. In: *SCHALM'S VETERINARY HEMATOLY SIXTH EDITION*. Wiley-Blackwell. p. 1082-100.

32. 1-s2.0-S0034528899903211-main.pdf effet hemolise [Internet]. [cité 14 févr 2018]. Disponible sur: https://ac.els-cdn.com/S0034528899903211/1-s2.0-S0034528899903211-main.pdf?_tid=6b51fee2-11ca-11e8-be6c-00000aab0f02&acdnat=1518642352_06a2343a53cebeb10838e4e0f21b33f8
33. Mischke R, Menzel D, Wolling H. Comparison of Different Methods to Measure Fibrinogen Concentration in Canine Plasma with Respect to Their Sensitivity towards the Fibrinogen Degradation Products X, Y and D. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2000;30(3):131-8.
34. Coagulation assays [Internet]. eClinpath. [cité 17 févr 2018]. Disponible sur: <http://www.eclinpath.com/hemostasis/tests/screening-coagulation-assays/>
35. Topper MJ, Prasse KW. Chromogenic assays for equine coagulation factors VII, VIII:C, IX, and X, and C1-esterase inhibitor. *Am J Vet Res*. mai 1998;59(5):538-41.
36. Yu R, Ding S, Tan W, Tan S, Tan Z, Xiang S, et al. Performance of Protein Induced by Vitamin K Absence or Antagonist-II (PIVKA-II) for Hepatocellular Carcinoma Screening in Chinese Population. *Hepat Mon* [Internet]. 22 juill 2015 [cité 23 juin 2018];15(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4539732/>
37. Zhang D, Liu Z, Yin X, Qi X, Lu B, Liu Y, et al. Prognostic value of PIVKA-II in hepatocellular carcinoma patients receiving curative ablation: A systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers*. 16 avr 2018;1724600818760234.
38. Bon C, Brillard B, Gelineau M-C, Mailliavin A, Trépo C, Pichot J. La décarboxyprothrombine : intérêt dans le diagnostic du carcinome hépatocellulaire. *Ann Biol Clin (Paris)*. 26 mars 1998;56(2):175-81.
39. Yu R, Xiang X, Tan Z, Zhou Y, Wang H, Deng G. Efficacy of PIVKA-II in prediction and early detection of hepatocellular carcinoma: a nested case-control study in Chinese patients. *Sci Rep* [Internet]. 12 oct 2016 [cité 6 juin 2018];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5059731/>
40. Rozanski EA, Drobatz KJ, Hugher D, Scotti M, Giger U. Thrombotest (PIVKA) Test Results in 25 Dogs with Acquired and Hereditary Coagulopathies. *J Vet Emerg Crit Care*. 9(2):73-8.
41. Thromboélastométrie rotative : réhabilitation de l'ancienne thromboélastographie [Internet]. [cité 1 mars 2018]. Disponible sur: https://ac.els-cdn.com/S0923253206001013/1-s2.0-S0923253206001013-main.pdf?_tid=87425f37-f952-4136-b52d-3cf152f77530&acdnat=1519933358_4ff6376cf70fcc416d959c0e0cb8dded
42. Weiss DJ, Wardrop KJ. Hemostasis : Hereditary coagulopathies. In: SCHALM'S VETERINARY HEMATOLOGY SIXTH EDITION. Wiley-Blackwell. p. 661-7.
43. Brooks MB, Gu W, Barnas JL, Ray J, Ray K. A Line 1 insertion in the Factor IX gene segregates with mild hemophilia B in dogs. *Mamm Genome*. 1 nov 2003;14(11):788-95.
44. Brooks M. A review of canine inherited bleeding disorders: biochemical and molecular strategies for disease characterization and carrier detection. *J Hered*. 1 janv 1999;90(1):112-8.
45. Giannelli F, Green PM, Sommer SS, Poon M, Ludwig M, Schwaab R, et al. Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions--eighth edition. *Nucleic Acids Res*. 1 janv 1998;26(1):265-8.

46. A Deletion Mutation Causes Hemophilia B In Lhasa Apso Dogs [Internet]. [cité 24 juin 2018]. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/88/9/3451.full.pdf>
47. Nichols TC, Dillow AM, Franck HWG, Merricks EP, Raymer RA, Bellinger DA, et al. Protein Replacement Therapy and Gene Transfer in Canine Models of Hemophilia A, Hemophilia B, von Willebrand Disease, and Factor VII Deficiency. *ILAR J.* 1 janv 2009;50(2):144-67.
48. Goree M, Catalfamo JL, Aber S, Boudreaux MK. Characterization of the Mutations Causing Hemophilia B in 2 Domestic Cats. *J Vet Intern Med.* 19(2):200-4.
49. Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences [Internet]. [cité 20 janv 2018]. Disponible sur: <http://www.pnas.org/content/86/24/10095.full.pdf>
50. B Brooks M, Gu W, Ray K. Complete deletion of factor IX gene and inhibition of factor IX activity in a Labrador Retriever with hemophilia B. *J Am Vet Med Assoc.* 1 janv 1998;211:1418-21.
51. Brinkhous KM, Sigman JL, Leppanen SD, Rup BJ, Keith JC. Recombinant Human Factor IX: Replacement Therapy, Prophylaxis, and Pharmacokinetics in Canine Hemophilia B. :9.
52. Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin H-F, et al. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med.* janv 1999;5(1):64-70.
53. Russell KE. Reduced bleeding events with subcutaneous administration of recombinant human factor IX in immune-tolerant hemophilia B dogs. *Blood.* 15 déc 2003;102(13):4393-8.
54. Ehrhardt A. A gene-deleted adenoviral vector results in phenotypic correction of canine hemophilia B without liver toxicity or thrombocytopenia. *Blood.* 5 juin 2003;102(7):2403-11.
55. Murphy SL, High KA. Gene therapy for haemophilia. *Br J Haematol.* mars 2008;140(5):479-87.
56. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood.* 15 avr 2003;101(8):2963-72.
57. Herzog RW, Mount JD, Arruda VR, High KA, Lothrop CD. Muscle-Directed Gene Transfer and Transient Immune Suppression Result in Sustained Partial Correction of Canine Hemophilia B Caused by a Null Mutation. *Mol Ther.* sept 2001;4(3):192-200.
58. Arruda VR. Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood.* 1 janv 2004;103(1):85-92.
59. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJE, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* mars 2006;12(3):342-7.
60. Bezeaud A, Vidaud D, Guillin M-C. Les déficits constitutionnels en prothrombine et les informations qu'ils peuvent nous apporter sur la structure et les fonctions de la prothrombine. *Hématologie.* 1 déc 2005;11(6):397-407.
61. Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmbäck K, et al. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 23 juin 1998;95(13):7597-602.

62. Callan MB, Aljamali MN, Margaritis P, Griot-Wenk ME, Pollak ES, Werner P, et al. A novel missense mutation responsible for factor VII deficiency in research Beagle colonies. *J Thromb Haemost.* 4(12):2616-22.
63. Giansily-Blaizot M, Aguilar-Martinez P, Biron-Andreani C, Jeanjean P, Igual H, Schved J-F. Analysis of the genotypes and phenotypes of 37 unrelated patients with inherited factor VII deficiency. *Eur J Hum Genet.* févr 2001;9(2):105-12.
64. Spurling NW, Burton LK, Peacock R, Pilling T. Hereditary Factor-VII Deficiency in the Beagle. *Br J Haematol.* 23(1):59-67.
65. Kaae JA, Callan MB, Brooks MB. Hereditary Factor VII Deficiency in the Alaskan Klee Kai Dog. *J Vet Intern Med.* 21(5):976-81.
66. Macpherson R, Scherer J, Ross ML, Gentry PA. Factor VII deficiency in a mixed breed dog. *Can Vet J.* juill 1999;40(7):503-5.
67. Perry DJ. Factor VII Deficiency. *Br J Haematol.* 118(3):689-700.
68. Mariani G, Konkle BA, Ingerslev J. Congenital factor VII deficiency: therapy with recombinant activated factor VII – a critical appraisal. *Haemophilia.* 12(1):19-27.
69. Dodds WJ. Canine factor X (Stuart-Prower factor) deficiency. *J Lab Clin Med.* 1 oct 1973;82(4):560-6.
70. Cook AK, Werner LL, O'Neill SL, Brooks M, Feldman BF. Factor X Deficiency in a Jack Russell Terrier. *Vet Clin Pathol.* 22(3):68-71.
71. Mason DJ, Abrams-Ogg A, Allen D, Gentry PA, Gadd KR. Vitamin K-Dependent Coagulopathy in a Black Labrador Retriever. *J Vet Intern Med.* 16(4):485-8.
72. Brenner B, Sánchez-Vega B, Wu S-M, Lanir N, Stafford DW, Solera J. A Missense Mutation in γ -Glutamyl Carboxylase Gene Causes Combined Deficiency of All Vitamin K-Dependent Blood Coagulation Factors. *Blood.* 15 déc 1998;92(12):4554-9.
73. Fregin A, Rost S, Wolz W, Krebsova A, Muller CR, Oldenburg J. Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K–dependent clotting factors to the centromeric region of chromosome 16. *Blood.* 1 nov 2002;100(9):3229-32.
74. Weiss DJ, Wardrop KJ. Hemostasis : Acquired coagulopathies. In: SCHALM'S VETERINARY HEMATOLOGY SIXTH EDITION. Wiley-Blackwell. p. 654-60.
75. Coagulation disorders in dogs with hepatic disease [Internet]. [cité 20 janv 2018]. Disponible sur: https://ac.els-cdn.com/S1090023309002007/1-s2.0-S1090023309002007-main.pdf?_tid=20313aa6-fdfa-11e7-83c3-00000aacb35d&acdnat=1516463818_6b1d7defc385e81974a8eb774f4f7789
76. Denninger M-H. Exploration de l'hémostase dans les maladies du foie. :13.
77. Webster CRL. Hemostatic Disorders Associated with Hepatobiliary Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* mai 2017;47(3):601-15.
78. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* déc 2012;41(4):441-53.

79. al FE et. Cross-laboratory audit of normal reference ranges and assessment of ABO blood group, gender and age on detected levels of plasma coagulation factors. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 11 sept 2018]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269935>
80. LEFEBVRE S. ETUDE DE L'IMPACT DU SEXE SUR LA COAGULATION VITAMINE K DEPENDANTE CHEZ LE RAT. Université Claude Bernard Lyon 1 - Ecole Doctorale « EDISS »; 2016.

Annexe 2 :

Lettre d'information aux propriétaires.



Lettre d'information aux propriétaires

Madame, Monsieur,

Vous êtes invités à participer avec votre animal à la campagne de prélèvements sanguins mise en place par VetAgro Sup dans le cadre du projet de recherche « Statut vitamine K et protéines vitamine-K dépendantes chez le chien et le chat : établissement de valeurs de référence, évaluation dans différentes affections spontanées ».

Pour cela, nous vous demandons simplement l'autorisation de réaliser une prise de sang à votre animal. Hormis ce prélèvement et de répondre à quelques questions sur votre animal, aucune procédure supplémentaire ne vous sera demandée.

Avant que vous n'acceptiez de faire participer votre animal à cette étude, nous vous invitons à prendre connaissance de ses implications en termes d'organisation, avantages et risques éventuels, afin que vous puissiez prendre une décision en toute connaissance de cause. Ceci s'appelle donner un « consentement éclairé ».

Vous devez en effet savoir que votre participation est volontaire et doit rester libre de toutes contraintes. Elle nécessite donc la signature d'un document exprimant votre consentement.

Objectifs et déroulement de l'étude :

Responsable du projet : Dr Vét. E. Krafft, maître de conférences en médecine interne

Cette étude est réalisée pour déterminer les valeurs normales des taux sanguins de différents facteurs vitamine-K dépendants chez le chien et le chat. Ces valeurs obtenues chez des animaux sains serviront ensuite de valeurs de référence auxquelles pourront être comparés les résultats obtenus chez des animaux atteints de différentes maladies. Le but à terme est de mieux comprendre les paramètres intervenant dans le statut vitamine K chez l'animal sain et le rôle de cette vitamine dans différentes maladies spontanées chez l'animal et éventuellement déterminer des cibles thérapeutiques.

Pour pouvoir être inclus dans l'étude votre animal doit être un chien ou un chat adulte (âgé d'au moins un an), mâle ou femelle, quel que soit sa race. Différentes informations vous seront demandées à propos de votre animal et de son mode de vie.

La participation à l'étude durera simplement le temps de la prise de sang.

Le responsable de l'étude utilisera les échantillons collectés dans le cadre de l'étude à laquelle vous participez mais pourra également les utiliser dans le cadre d'autres recherches (biochimiques, hématologiques, génétiques, immunologiques...)

Description des risques et bénéfices

La réalisation de la prise de sang est conforme aux bonnes pratiques médicales vétérinaires. Elle sera mise en œuvre par des étudiants vétérinaires formés à la réalisation de cet acte, sous la supervision d'un vétérinaire diplômé ou par directement par un vétérinaire diplômé. La participation de votre animal à ce prélèvement sanguin n'engendre aucun risque supplémentaire autre que ceux pouvant être observés lors de la réalisation d'une prise de sang (notamment hématome). Il est possible que pour le bon déroulement de l'acte médical, il soit nécessaire d'effectuer une tonte des poils de votre animal dans la zone de prélèvement. Si vous y êtes opposé, merci de le signaler à la personne en charge de la prise de sang.

Tout animal témoignant son intolérance à la contention inhérente à la réalisation du prélèvement ou trop agressif pour être manipulé sans risque ne sera pas inclus par mesure de précaution et par respect des règles du bien-être animal.

La participation de votre animal à cette étude lui permettra de bénéficier d'un bilan de santé gratuit : examen clinique et bilan sanguin de base. Vous ne percevrez aucune indemnisation pour votre participation à cette étude mais les résultats du bilan sanguin vous seront communiqués ultérieurement par mail.

Retrait de consentement

Votre participation est volontaire et vous avez le droit de retirer votre consentement à participer à l'étude pour quelque raison que ce soit, sans devoir vous justifier. Si vous retirez votre consentement, afin de garantir la validité de la recherche, les données codées jusqu'au moment de votre interruption seront conservées.

Garantie de confidentialité

Votre participation à l'étude signifie que vous acceptez que des données concernant votre animal soient recueillies et que le responsable de l'étude les utilise dans un objectif de recherche et dans le cadre de publications scientifiques et médicales.

Le responsable de l'étude a un devoir de confidentialité vis à vis des données collectées. Ceci veut dire qu'il s'engage non seulement à ne jamais divulguer votre nom dans le cadre d'une publication ou d'une conférence mais aussi à ce que vos données soient codées.

Si vous avez la moindre question, n'hésitez pas à nous en faire part.

Annexe 3 :

Consentement éclairé.



Consentement éclairé pour l'animal :

Propriétaire du chien/ du chat

Je soussigné(e), atteste être le propriétaire de l'animal.....

Je déclare avoir été informé sur la nature de l'étude, son but, sa durée, les éventuels bénéfices et risques et ce que l'on attend de moi et de mon animal. J'assure avoir lu et compris la lettre d'information qui m'a été fournie avec ce consentement, avoir posé toutes les questions que j'ai jugées utiles pour prendre ma décision, et avoir compris les réponses qui m'ont été apportées, sans aucune ambiguïté.

J'assure avoir été entièrement informé des risques, et sais que je ne pourrai tenir responsable VetAgro Sup de tout événement indésirable lié au prélèvement.

J'accepte que mon animal soit inclus dans l'étude clinique : « Statut vitamine K et protéines vitamine-K dépendantes chez le chien et le chat : établissement de valeurs de référence, évaluation dans différentes affections spontanées ».

J'accepte que des échantillons biologiques soient prélevés selon le protocole, utilisés et conservés par VetAgro Sup à des fins de recherche ou de conservation (biothèque).

J'accepte que les informations que j'ai communiquées sur mon animal soient utilisées pour remplir les objectifs de ce projet.

Je m'engage à signaler tout événement anormal concernant mon animal qui aurait eu lieu dans les 15 jours précédant ou suivant la prise de sang.

J'accepte d'être contacté(e) par VetAgro Sup :

Email (indispensable pour l'envoi des résultats du bilan sanguin) : _____@ _____

Téléphone : _____

Fait à Le..... en 2 exemplaires

Signature précédée de la mention « Lu et approuvé » :

Annexe 4 :

Protocole de traitement des échantillons des chiens « Ref ».

Etude PVKD : Protocole de traitement des échantillons

Arrivée des tubes :

Attribuer un identifiant d'étude « PVKD-XXX » à l'animal, indiquer la date de prélèvement.

Tubes hépariné et citaté :

- Centrifuger le tube hépariné (le garder le plus possible à l'abri de la lumière) et le tube citaté.

- Prélever la quantité de sang nécessaire pour les analyses biochimiques dans le tube hépariné.

-Pour le tube hépariné : remplir 3 tubes Eppendorf opaques identifiés avec les étiquettes « PVKD-Heparine XXX). 500 µL de plasma dans les deux premiers, la quantité restante dans le dernier.

-Pour le tube citaté : remplir 3 cryotubes identifiés avec les étiquettes « PVKD-Citrate XXX ». 250 µL dans les deux premiers, la quantité restante dans le dernier.

Ranger les tubes dans les boîtes identifiées « Etude PVKD boîte X ».

Tube EDTA :

-Prélever la quantité nécessaire de sang pour la réalisation de l'hémogramme (+/- frottis si nécessaire).

-Transférer la totalité du sang restant dans le cryotube identifié avec étiquettes « PVKD-EDTA XXX ».

Ranger les tubes dans les boîtes identifiées « Etude PVKD boîte X ».

Reporter dans le classeur l'emplacement des tubes pour chaque échantillon « PVKD-XXX » (+ indiquer éventuellement la présence d'hémolyse ou de lipémie) tel que :

Tubes héparinés : Boîte X emplacement A, B, C.

Tubes citatés : Boite X emplacement D, E, F (à la suite des tubes héparinés).

Tube EDTA : Boîte X emplacement G (à la suite des tubes citatés).

Annexe 5 :

Protocoles de dosage des facteurs II, VII, IX et X chez l'homme d'après Hyphen BioMed.



155 rue d'Eragny
95000 NEUVILLE-SUR-OISE (FRANCE)
Tel: +33 (0)1 34 40 85 10 - Fax: +33 (0)1 34 48 72 36
Email : info@hyphen-biomed.com
Web site: www.hyphen-biomed.com

BIOPHEN CS-01(38)
Thrombin Chromogenic substrate
Vial of 25 mg/flacon de 25 mg
Set of 12x25 mg (229001C) / Coffret de 12x25 mg (229001C)
Set of 50x25 mg (229001Z) / Coffret de 50x25 mg (229001Z)

Ref. 229001 / 229001C / 229001Z

**STORE AT
2-8°C**

FOR RESEARCH USE ONLY.
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC
PROCEDURES.

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.
NE PAS UTILISER DANS LES PROCEDURES DE
DIAGNOSTIC.

**CONSERVER A
2-8°C**

English, last revision 03-2017

Français, dernière révision 03-2017

ORIGIN

Synthetic generic Chromogenic substrate, highly purified and stabilized.

SPECIFICITY

Recommended substrate for Thrombin.

PRESENTATION

Each vial contains about 25 mg of BIOPHEN CS-01(38), lyophilized in presence of Mannitol as a bulking agent.

This kit is for research use only and should not be used for patient diagnosis or treatment.

RECONSTITUTION

According to the research protocol used, the BIOPHEN CS-01(38) chromogenic substrate can be restored with variable volumes of distilled water; for example 5 mL can be used for a substrate concentration of 5 mg/mL, or 20 mL for a substrate concentration of 1.25 mg/mL.

PEPTIDE SEQUENCE: H-D-Phe-Pip-Arg-pNa. 2HCl.

CHEMICAL STRUCTURE: C₂₇H₃₆N₄O₆. 2HCl.

MOLARITY: 45 µMoles.

PURITY GRADE: ≥ 95%.

MOLECULAR WEIGHT (-2HCL): 553 Da.

MOLECULAR WEIGHT (+2HCL): 625 Da.

FREE PNA CONTENT (MEASURED ON SUBSTRATE AT 2.50M): OD_{420nm} ≤ 0.30.

USE:

All research studies and protocols where a source of chromogenic substrate for Thrombin is required.

The results obtained should be for research purposes only and not used for patient diagnosis or treatment.

RESPECTIVE REACTIVITIES:

Thrombin	FXa	Plasmin	Kallicrein	aPC
100	5	5	60	40

Assay conditions must be established for making the substrate totally specific for Thrombin.

STABILITY:

- Restored:
- 7 days at room temperature (18-25°C).
 - 3 months at 2-8°C.
 - Do not freeze.

Lyophilized:

- Until the expiration date printed on the vial.

ORIGINE

Substrat Chromogène générique synthétique hautement purifié et stabilisé.

SPECIFICITE

Substrat préconisé pour la Thrombine.

PRESENTATION

Chaque flacon contient environ 25 mg de BIOPHEN CS-01(38), lyophilisé en présence de Mannitol comme ballast.

Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

RECONSTITUTION

Selon le protocole de recherche utilisé, le substrat chromogénique BIOPHEN CS-01(38) peut être reconstitué avec des volumes variables d'eau distillée. Par exemple, pour obtenir une concentration du substrat de 5 mg/mL, le volume de reconstitution sera de 5 mL, ou 20 mL pour une concentration de 1.25 mg/mL.

SEQUENCE PEPTIDIQUE: H-D-Phe-Pip-Arg-pNa. 2HCl.

STRUCTURE CHIMIQUE: C₂₇H₃₆N₄O₆. 2HCl.

MOLARITE: 45 µMoles.

DEGRE DE PURETE: ≥ 95%.

POIDS MOLECULAIRE (-2HCL): 553 Da.

POIDS MOLECULAIRE (+2HCL): 625 Da.

PRESENCE DE PNA LIBRE (MESURE SUR SUBSTRAT A 2.50M): OD_{420nm} ≤ 0.30.

UTILISATION:

Toutes les études ou protocoles dans lesquels l'utilisation d'une source de Substrat chromogénique spécifique de la Thrombine est nécessaire.

Les résultats obtenus doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.

REACTIVITES RESPECTIVES:

Thrombine	FXa	Plasmine	Kallicreine	PCa
100	5	5	60	40

Les conditions opératoires doivent être établies pour que le substrat soit totalement spécifique de la Thrombine.

STABILITE DU FLACON

- Reconstitué:
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
 - 3 mois à 2-8°C.
 - Ne pas congeler.
- Lyophilisé:
- Jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.

BIOPHEN FVII

Ref : 221304 (R1, R3: 2 x 4 mL; R2: 2 x 2 mL; R4: 4 x 25 mL)

Méthode chromogénique pour la détermination quantitative du facteur VII.
POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

Français, dernière révision : 09-2016

UTILISATION

Le coffret BIOPHEN FVII est une méthode chromogénique proposée pour la détermination quantitative de l'activité du facteur VII en milieu purifié ou plasmas citratés, en utilisant une méthode chromogénique, manuelle ou automatisée.

Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.

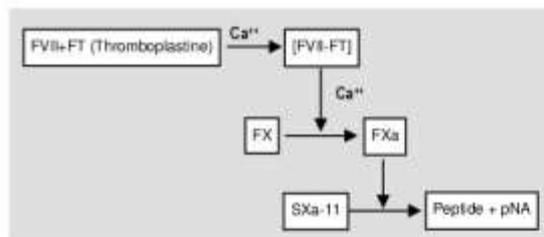
RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le facteur VII est la sérine estérase de la voie exogène de la coagulation. Complexée au facteur tissulaire (FT), en présence de phospholipides et de calcium, il active le facteur X en facteur Xa.

Le coffret BIOPHEN FVII est un dosage chromogénique du facteur VII.

PRINCIPE

En présence de facteur tissulaire (thromboplastine de lapin) et de calcium, le facteur VII forme un complexe enzymatique qui active le facteur X, présent en quantité constante et en excès, en facteur Xa. La quantité de facteur Xa formée est fonction du taux de Facteur VII à doser. Ce facteur Xa ainsi formé clive le substrat spécifique du Xa (Sxa-11) et libère le pNA. La quantité de pNA libéré est directement proportionnelle à l'activité du facteur Xa. Le taux de Facteur VII présent dans l'échantillon à doser est donc directement proportionnel à l'activité du facteur Xa formée, déterminé par la quantité de pNA libéré, et mesurée par la densité optique à 405nm.



REACTIFS

R1 - Réactif 1 : Factor X (Human), lyophilisé. Contient du facteur X à la concentration optimale pour le test, 2 flacons de 4 mL.

R2 - Réactif 2 : Thromboplastin calcium, lyophilisé. Contient de la thromboplastine de cerveau de lapin et du calcium, 2 flacons de 2 mL.

R3 - Réactif 3 : Sxa-11, lyophilisé. Substrat chromogénique spécifique du facteur Xa (Sxa-11). Contient 8 mg de Sxa-11, 2 flacons de 4 mL.

R4 - Réactif 4 : Tris-BSA buffer à pH 7,40. Prêt à l'emploi, 4 flacons de 25 mL.

Le réactif 4 contient de faibles quantités d'azide de sodium (0,9 g/L), voir MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un coffret ayant le même numéro de lot. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précaution afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation. Éviter autant que possible toute évaporation des réactifs lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air. L'évaporation réduit la stabilité du réactif à bord de l'automate.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante pendant une période courte, sans aucun dommage.
- Pour usage in vitro.

PRÉPARATION ET STABILITÉ DES REACTIFS

Les flacons sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.

R1: Réactif 1 : Factor X (Human)

Reconstituer chaque flacon avec exactement 4 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser le réactif pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- 48 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25 °C).
- Ne pas congeler.

R2: Réactif 2 : Thromboplastin calcium

Reconstituer chaque flacon avec exactement 2 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser le réactif pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- 48 heures à 2-8°C.
- 8 heures à température ambiante (18-25 °C).
- Ne pas congeler.

R3: Réactif 3 : Sxa-11 (Factor Xa specific chromogenic substrate)

Reconstituer chaque flacon avec exactement 4 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser le réactif pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.

Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :

- 3 mois à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25 °C).
- Ne pas congeler.

R4: Réactif 4 : Tris-BSA buffer

Prêt à l'emploi. Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.

Le réactif, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine à 2-8°C est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS

Reactifs:

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou d'acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Reference
BIOPHEN Plasma Calibrator	222101-RUO
BIOPHEN Normal Control Plasma	223201-RUO
BIOPHEN Abnormal Control Plasma	223301-RUO

Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogéniques.
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes en plastique ou microplaque.

PRÉLEVEMENTS

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur.

Echantillons :

Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique).

Prélevement :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 vol) (0,106M) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

Centrifugation :

Dans les deux heures, utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes, par exemple un minimum de 15 minutes à 2500 g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

- **Conservation du plasma :**
 - 4 heures à température ambiante (18-25°C)
 - 1 mois à -20°C.
 - 18 mois à -70°C.

Les échantillons de plasma congelé doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés immédiatement. Resuspendre tout précipité en agitant vigoureusement immédiatement après décongelation et avant utilisation.

PROCEDURE :

Le coffret BIOPHEN FVII peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est évaluée à 405nm.

Méthode automatisée :

Les applications sur les différents automates sont disponibles sur demande. **Se reporter à l'application spécifique et aux précautions spécifiques de chaque automate.**

Méthode de dosage :

1. La calibration est réalisée à l'aide d'un plasma étalon de concentration (C) en facteur VII précisément définie ou d'un pool de plasma citrates normaux (au moins 30 individus normaux, hommes ou femmes de 18 à 55 ans, sans traitements ou pathologies connues) qui par définition titre 100% de facteur VII. Le dosage intègre une dilution standard du plasma au 1/1000. La dilution du plasma au 1/1000 représente par définition le taux 100% de l'activité du facteur VII. La gamme de calibration va de 0 à 200% de facteur VII. La dilution au 1/500 du pool de plasma ou de l'étalon représente 200% de l'activité du facteur VII. La dilution au 1/1000 correspond à la concentration (C) en FVII indiquée, et le 1/500 à deux fois cette concentration. Pour un étalon titrant C, le taux de 200% (dans les conditions de dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant : 1/500.

Afin d'obtenir une dilution précise, prédiluer le pool de plasma au 1/25 puis 1/20 en tampon Tris-BSA (R4), pour obtenir une dilution finale de 1/500 (soit 200% de facteur VII). A partir de cette solution, faire la gamme de calibration suivante :

FVII (%)	0	50	100	200
Plasma étalon dilué au 1/500 (µL)	0	125	250	500
R4-Tampon Tris-BSA (µL)	500	375	250	0

2. Diluer les échantillons dans du tampon Tris-BSA (R4) comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Dilution
Contrôles	223201-RUO 223301-RUO	1/1000
Echantillons	n.a	1/1000

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec des contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés dans 2 heures, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C).

3. Pour les milieux purifiés avec une concentration en facteur VII différente des plasmas, diluer l'échantillon en R4 afin d'obtenir une concentration finale en facteur VII comprise entre 0,1 et 1 ng/mL (soit 20 à 200% de facteur VII selon ce protocole).

4. Dans un tube plastique ou dans les puits d'une microplaque incubé à 37°C, introduire :

	Microplaque	Tube plastique
Etalon, Contrôles, ou échantillons dilués au 1/1000	30 µL	100 µL
R2: Thromboplastin Calcium préincubée à 37°C	30 µL	100 µL
R1: Facteur X (humain) préincubé à 37°C	60 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 7 minutes, puis introduire :		
R3: SKa-11 préincubé à 37°C	50 µL	100 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant exactement 5 minutes:		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (2%) ¹	80 µL	200 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

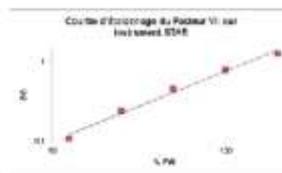
¹Du acide citrique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures.
Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse à celui du test : Acide Citrique (2%), R3, R1, R2, échantillon dilué.
Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION :

Le test BIOPHEN FVII peut être calibré pour le dosage du facteur VII. L'étalon couvrant la zone de test dynamique est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

La courbe de calibration ci-dessous, obtenue avec l'étalon BIOPHEN Plasma Calibrator sur STA-R[®], est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être lissée.



CONTROLE QUALITE :

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la courbe de calibration ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Des contrôles qualité doivent être inclus dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire afin de valider les résultats du test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactifs, ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir et vérifier ses propres valeurs cibles, les zones d'acceptation et les performances attendues, selon les instruments et les protocoles utilisés.

RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer sur papier logarithmique la droite de calibration, en portant en abscisses la concentration de facteur VII (%) et en ordonnées la DO₄₀₅ (nm) correspondante.
 - La concentration de facteur VII dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration.
 - Les résultats sont exprimés en % de facteur VII.
 - Si la dilution utilisée est 1/1000, le taux de facteur VII est obtenu directement sur la courbe. Si d'autres dilutions sont utilisées, le taux mesuré, doit être multiplié par le facteur de dilution = D ÷ divisé par 1000, soit D/1000.
- Les résultats obtenus doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.

LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test, suivre scrupuleusement les instructions techniques.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.

PERFORMANCES :

- La limite basse de détection est 5%.
- Le domaine de mesure est compris entre 5 et 200%.

REFERENCES :

1. Seligsohn U, et al. Coupled amidolytic assay for factor VII: its use with a clotting assay to determine the activity state of factor VII Blood. 1978.
2. Clarke BJ, et al. The first epidermal growth factor domain of human coagulation factor VII is essential for binding with tissue factor. FEBS. 1992.
3. Ledwozyw A, et al. The estimation of factor VII in livestock plasma of domestic animals by the use of tripeptide chromogenic substrate. Arch Vet Pol. 1993.
4. Chang YJ, et al. Engineered recombinant factor VII Q217 variants with altered inhibitor specificities. Biochemistry. 1999.
5. Natscha CJ, et al. Increased volume of distribution for recombinant activated factor VII and longer plasma-derived factor VII half-life may explain their long lasting prophylactic effect. Thrombosis Research. 2013.
6. Dorfin JR. Development and mechanistic analysis of in vivo liposomal nanoparticle delivery of siRNA and miRNA. B.A. Biological Chemistry Swarthmore College. 2006.
7. Woodhams B, et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis. 2001.

SYMBOLES :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1.



BIOPHEN™ FIX

REF 221802

R1 R2 R3 2 x 2,5 mL; R4 2 x 25 mL

Méthode chromogène pour dosage du Facteur IX
sur plasma ou concentrés thérapeutiques

Français, dernière révision : 11-2016

UTILISATION

Le coffret BIOPHEN™ FIX est une méthode chromogène proposée pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité du Facteur IX sur plasma humain citraté ou concentrés thérapeutiques, en utilisant une méthode analytique, automatisée ou manuelle.

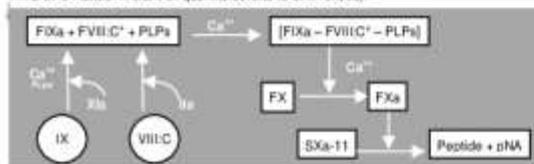
RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le Facteur IX (FIX) est une glycoprotéine vitamine K dépendante d'environ 55KDa, intervenant dans les phases intermédiaires de la coagulation. Sa concentration normale dans le plasma humain est d'environ 4 à 5 µg/mL. Activé par le Facteur XIa, en présence de calcium, le Facteur IX(a) forme un complexe actif avec le Facteur VIII-C, en présence de calcium et phospholipides, qui active le Facteur X en Facteur Xa.

Le coffret BIOPHEN™ FIX est proposé pour le dosage de l'activité du Facteur IX sur plasma ou concentrés thérapeutiques, ou tout autre liquide biologique où ce facteur est recherché.

PRINCIPE

La méthode BIOPHEN™ FIX est un dosage chromogène de l'activité du Facteur IX (FIX). En présence de phospholipides (PLPs) et calcium, le Facteur XIa (FXIa) active le FIX, présent dans l'échantillon testé, en Facteur IX activé. Le Facteur VIII-C activé (FVIIIa) par la thrombine, forme un complexe enzymatique avec le Facteur IXa pour activer le Facteur X. Le Facteur Xa ainsi formé hydrolyse le substrat chromogène qui libère de la p-nitrocatéchine (pNA). La quantité de pNA libérée (mesurée par Absorbance à 405nm) est directement proportionnelle à la concentration de Facteur IX dans l'échantillon (le Facteur XIa, le Facteur VIII-C et le Facteur X étant en quantité constante et en excès).



Nota : FVIII-C⁺ FVIII-C activé par la thrombine.

REACTIFS

- R1 Réactif 1 : FX(h)-FVIII-C :** Facteur X humain, et FVIII-C, lyophilisé. Contient du calcium chlorure dihydrate, du sulfate de cuivre, un inhibiteur de polymérisation de la fibrine et des stabilisants.
2 flacons de 2,5 mL.
- R2 Réactif 2 : Réactif activateur :** lyophilisé. Contient du Facteur XIa humain, en quantité constante et optimisée, de la thrombine humaine, du calcium chlorure dihydrate, de l'imidazole, des phospholipides synthétiques et des stabilisants.
2 flacons de 2,5 mL.
- R3 Réactif 3 : Substrat :** Substrat chromogène spécifique du Facteur Xa (SXA-11), lyophilisé. Contient un inhibiteur du Facteur XIa.
2 flacons de 2,5 mL.
- R4 Réactif 4 : Tampon :** Tampon réactionnel Tris-BSA. Contient 1% de BSA, PEG, des stabilisants du Facteur VIII-C et de l'acide de sodium (0,9g/L) comme conservateur.
2 flacons de 25 mL.

Le réactif R4 contient de faibles quantités d'acide de sodium (0,9g/L), voir MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS.

MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- L'acide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précautions afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation. Éviter autant que possible toute évaporation des réactifs lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air. L'évaporation réduit la stabilité du réactif à bord de l'automate.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante pendant une période courte, sans aucun dommage.
- Le plasma humain utilisé pour la préparation des Facteurs X, XIa et thrombine a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt d'anticorps VIH, de Hbs Ag et d'anticorps VCH. Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- Faire un blanc plasma si le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- Pour usage de diagnostic *in vitro*.

- R1** H015 : Provoque une irritation cutanée.
H019 : Provoque une sévère irritation des yeux.
H335 : Peut irriter les voies respiratoires.
H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

- R2** H014 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
H318 : Provoque des lésions oculaires graves.
H060D : Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.

PRÉPARATION ET STABILITÉ DES REACTIFS

Les flacons sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.

- R1 Réactif 1: FX(h)-FVIII-C :**
Reconstituer chaque flacon avec exactement 2,5 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.
Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.
La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
- 24 heures à 2-8°C.
 - 8 heures à température ambiante (18-25 °C).
 - 2 mois congelé à -20°C ou moins

- R2 Réactif 2: Réactif activateur :**
Reconstituer chaque flacon avec exactement 2,5 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps.
Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.
La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
- 24 heures à 2-8°C.
 - 8 heures à température ambiante (18-25°C).
 - 2 mois congelé à -20°C ou moins

- R3 Réactif 3: Substrat :**
Reconstituer chaque flacon avec exactement 2,5 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C) en agitant de temps en temps, jusqu'à dissolution complète. Vérifier l'absence de dépôt sur le fond du flacon.
Homogénéiser le réactif avant chaque utilisation.
La stabilité du réactif après reconstitution, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
- 1 mois à 2-8°C.
 - 7 jours à température ambiante (18-25 °C).
 - 2 mois congelé à -20°C ou moins

*Décongeler une seule fois le plus rapidement possible à 37°C en adaptant la durée d'incubation au volume de réactif. La stabilité du réactif décongelé doit être vérifiée dans les conditions de travail du laboratoire.

- R4 Réactif 4: Tampon :**
Prêt à l'emploi. Laisser stabiliser pendant 30 minutes à température ambiante (18-25°C), avant utilisation.
Bien homogénéiser avant chaque utilisation.
Dans son emballage d'origine, et conservé à 2-8°C, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- Reactifs :**
- Eau distillée.
 - Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
 - Matériel de référence pour dosage des concentrés thérapeutiques en Facteur IX (international ou interne).
 - Étalons et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Reference
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

- Pour réaliser l'étalonnage en gamme basse, diluer l'étalon en plasma déficient Facteur IX (DF505AK).

Matériels :

- Spectrophotomètre ou automate pour dosage chromogène.
- Chromomètre, Pipettes calibrées.

PRÉLEVEMENTS

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les États-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5 pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

- Échantillons :**
Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique).
- Prélèvement :**
Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M) avec précautions, par ponction veineuse fraîche. Le premier tube doit être éliminé.

Centrifugation :

Dans les deux heures, utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes, par exemple un minimum de 15 minutes à 2500g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

Conservation du plasma :

- o 4 heures à température ambiante (18-25°C).
- o 6 mois à -20°C.
- o 24 mois à -70°C.

Les échantillons de plasma congelé doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés immédiatement. Resuspendre tout précipité en agitant vigoureusement immédiatement après décongélation et avant utilisation.

PROCEDURE :

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est évaluée à 405nm.

Méthode automatisée :

Les applications sur les différents automates sont disponibles sur demande. Se reporter à l'application spécifique et aux précautions spécifiques de chaque automate.

Méthode de dosage :

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans le tampon R4 comme décrit ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration (C) défini la concentration en Facteur IX.

Gamme haute (5 à 200%) :

Lorsque la gamme de calibration est réalisée à l'aide d'un plasma étalon commercial (ex : BIOPHEN™ Plasma Calibrator), la dilution au 1/100 correspond à la concentration (C) en Facteur IX indiquée, et le 1/50 à deux fois cette concentration. Pour un étalon titrant C, le taux de 200% (dans les conditions de dosage) est obtenu en diluant cet étalon par le facteur suivant : 50x(C)/100.

La gamme de calibration peut également être réalisée à l'aide d'un pool de plasma citrés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connue), qui par définition titre 100% de Facteur IX. Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/100, qui représente par définition le taux 100% de Facteur IX. La gamme de calibration va de 5 à 200% de Facteur IX. La dilution au 1/50 en tampon R4 représente 200% de Facteur IX.

Préparer 2 mL de la dilution 1/50 du pool de plasmas citrés normaux, ou une dilution (50x(C)/100) du plasma étalon titré en Facteur IX (soit C1). Cette solution titre 200% Facteur IX ; préparer la gamme d'étalonnage suivante par dilutions successives dans le tampon R4 comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration.

Etalon	C1	C2	C3	C4	C5
FIX(%)	200	100	50	25	5
Volume Etalon	1000µL de C1	500µL de C1	500µL de C2	500µL de C3	100µL de C4
Volume Tampon R4	0µL	500µL	500µL	500µL	400µL

La gamme d'étalonnage peut également être réalisée à partir d'un matériel de référence titré en Facteur IX (standard international ou standard interne). Prélever ce matériel en tampon R4 pour obtenir une solution à 1 UI/mL puis effectuer une dilution au 1/50 en R4 pour obtenir une solution à 200% de Facteur IX. Effectuer à partir de cette solution une gamme d'étalonnage en tampon R4 comme expliqué précédemment.

Gamme basse (1 à 20%) :

L'étalonnage peut être réalisé à l'aide d'un pool de plasmas citrés normaux ou d'un plasma étalon commercial à taux de Facteur IX connu, soit C. Diluer ce plasma avec du plasma déficient en Facteur IX (DROSDA/K) de façon à obtenir un taux de 20 % (le facteur de dilution en plasma déficient est de 5 pour le pool normal, ou de 5x(C)/100 pour un étalon à taux C). Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/20. La gamme de calibration va de 1 à 20% de Facteur IX. La dilution au 1/20 en tampon R4 représente 20% de Facteur IX.

A partir de cette solution faire la gamme d'étalonnage suivante dans le tampon R4 :

FIX(%)	20	10	5	2,5	1
Volume Etalon 20% FIX	500µL	250µL	125µL	65µL	25µL
Volume Tampon R4	0µL	250µL	375µL	455µL	475µL

Réaliser la gamme extemporanément afin d'éviter toute dégradation du Facteur IX.

2. Diluer les échantillons dans le tampon R4 comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Gamme Haute	Dilution
Contrôle	223201/223301	Basse (après pré-dilution 1/10 en Déficient IX)	1/20
Echantillons	N.A.	Haute	1/100
		Basse	1/20

Pour les concentrés thérapeutiques de Facteur IX (et les fluides biologiques où le Facteur IX est recherché), l'échantillon à tester (en gamme haute) doit être pré-dilué en R4 pour obtenir une concentration de Facteur IX d'environ 1 UI/mL. Il est recommandé d'effectuer une pré-dilution, afin d'amener la concentration théorique de Facteur IX entre 0,2 et 2 UI/mL, puis une dilution 1/100 en R4 pour la réalisation du test. La concentration en Facteur IX attendue se situe ainsi entre 20 et 200%.

(La concentration mesurée doit ensuite être multipliée par le facteur de « pré-dilution »).

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés dans 2 heures, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le kit.

3. Introduire dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C :

Echantillons, contrôles ou étalons dilués en R4	Microplaque	Volume
R1: FIX(h)-VIII-C préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 2 minutes, puis introduire :		
R2: Réactif activateur préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 3 minutes puis introduire :		
R3: Substrat SXX-11 préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 2 minutes exactement		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (2%)	50 µL	200 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

OU acide oxalique (2%). Le contenu jaune est stable pendant 2 heures.

Le blanc, échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse de celui du test : Acide Citrique (2%), R3, R2, R1, échantillon dilué. Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

Méthode cinétique :

Le dosage peut être réalisé par méthode cinétique en mesurant le changement d'absorbance entre 10 et 100 secondes après l'addition du substrat (soit AA405). Dans ce cas il n'est pas nécessaire de soustraire le blanc échantillon, ni d'arrêter la réaction.

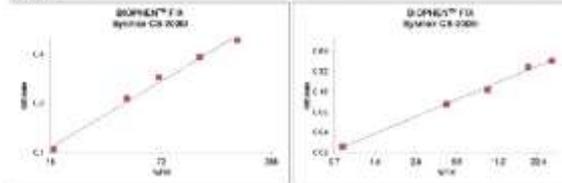
HYPHEN BioMed
95000 Neuville sur Oise - FRANCE

Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION :

Le test BIOPHEN™ FIX peut être calibré pour le dosage du Facteur IX sur plasmas ou concentrés thérapeutiques. L'étalon plasmatique couvrant la zone de test dynamique est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

Les courbes de calibration ci-dessous, obtenues sur Sysmex CS-2000 sont indiquées à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTROLE QUALITE :

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactif. Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode. Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle en point final, tracer sur papier logarithmique la droite étalon en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de Facteur IX en pourcentage.
- La concentration de Facteur IX dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, si la dilution standard est utilisée.
- Les résultats sont exprimés en % de Facteur IX.
- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.
- Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu est le taux mesuré, multiplié par le facteur de dilution complémentaire utilisé (par exemple en méthode manuelle, le taux obtenu est le taux mesuré multiplié par le facteur « D » utilisé et divisé par : 100, soit D/100, pour la gamme haute, et 20, soit D/20, pour la gamme basse).

LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed. Il est de la responsabilité du laboratoire de valider toutes les modifications apportées à ces instructions d'utilisation.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout prélèvement suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Tout plasma présentant un coagulum ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Aucun effet significatif n'est observé sur Sysmex CS-2000 (en gamme haute) pour des taux d'héparine jusqu'à 2UI/mL, de bilirubine inférieurs à 80 mg/dL, d'hémoglobine inférieurs à 1000 mg/dL et d'intralipides inférieurs à 1000 mg/dL, par tests de surcharge en plasma.

VALEURS ATTENDUES :

La valeur normale en Facteur IX d'un plasma adulte est généralement comprise entre 70 et 130%. Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal. Un déficit en Facteur IX (ou facteur anti-hémophilique B) (-25%) entraine la pathologie de l'hémophilie B, trouble de la coagulation congénital. Le taux de Facteur IX est diminué chez les patients sous traitement anti-vitamine K, ou dans les pathologies comme les atteintes hépatiques, cirrhose, CIVD. Des concentrations élevées de Facteur IX pourraient être un indicateur de risque accru de thrombose veineuse.

PERFORMANCES :

- La limite basse de détection sur automate est inférieure à 2% en gamme haute et inférieure à 0,5% en gamme basse.
- Le domaine de mesure sur Sysmex CS-2000 est compris entre 1 et 250% pour la gamme haute, et 0,5 à 30% pour la gamme basse (et faiblement autour de 5 à 200 % en gamme haute, et 1 à 20% en gamme basse).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur 1 lot de réactif sur Sysmex CS-2000. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 20 jours, 2 séries par jour et 2 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Gamme haute								Gamme basse			
	Intra-essai				Inter-essais				Intra-essais		Inter-essais	
	n	Moy.	SD	CV%	n	Moy.	SD	CV%	n	Moy.	SD	CV%
Normal	30	65,7	1,0	1,2	80	63,1	4,1	6,9	60	3,6	0,3	6,2
Anomal	30	36,5	0,9	2,4	80	35,7	2,0	5,9	60	3,6	0,3	6,4

REFERENCES :

1. Van Hylckama Vlieg A. et al., "High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis", Blood, 95(12):3878-82, 2000.
2. Taras LO, "Factor IX of the blood coagulation system: a review", Biochemistry (Moscow), 63(7):688-93, 1997.
3. Wagenvoort R. et al., "Development of a sensitive and rapid chromogenic FIX assay for clinical use", Haemostasis, 20(5): 276-88, 1990.
4. Pansik VI. et al., "Immunological heterogeneity of haemophilia B: a multicentre study of 88 kindreds", Br J Haematol, 40(4):543-55, 1978.
5. Ostvall RK. et al., "Detection of carriers of haemophilia B", Br J Haematol, 42(2):283-301, 1979.
6. www.ncbi.nlm.nih.gov, OMB, Haemophilia B, FIX deficiency, +36690, +134540, +134510, +134520.
7. CLSI Document H21-A5 : "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". F03 Edition, 20. 5, 2008.
8. Woodhams B. et al., Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood coagulation and Fibrinolysis, 2001.

SYMBOLES :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

D750-01/BI/1802/v1

BIOPHEN Factor X Ref 221705

Dosage Fonctionnel du Facteur X plasmatique, par
méthode colorimétrique.

POUR LA RECHERCHE UNIQUEMENT.

NE PAS UTILISER DANS LES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC.

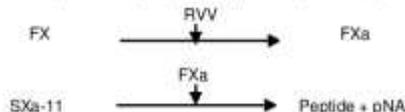
Dernière révision : 06/06/2014

UTILISATION :

Le coffret BIOPHEN Factor X est une technique chromogénique proposée pour la détermination in vitro de l'activité du Facteur X dans le plasma humain citraté, en méthode manuelle ou automatisée. **Ce coffret est à usage de recherche uniquement et ne doit pas être utilisé pour le diagnostic ou le traitement du patient.**

PRINCIPE :

La méthode BIOPHEN Factor X est un dosage chromogénique de l'activité du Facteur X. Dans le dosage BIOPHEN Factor X, le Facteur X plasmatique est dosé après activation spécifique en Facteur Xa par une enzyme extraite du venin de serpent, le RVV (Rusasil's viper venom). Le FXa ainsi formé hydrolyse alors le substrat peptidique du Facteur Xa (5Xa-11) en libérant de la para-nitroaniline (pNA), groupement chromophore mesuré à 405 nm. Le taux de Facteur X présent dans l'échantillon à doser est donc directement proportionnel à la quantité de FXa formé, déterminée par la quantité de pNA libérée, et mesurée par la densité optique à 405 nm.



REACTIFS :

R1 : Réactif 1 : Substrat 5Xa-11

Substrat chromogénique spécifique du Facteur Xa (5Xa-11), lyophilisé. 4 flacons d'environ 5 mg de 5Xa-11 (à reconstituer par 2,5 ml d'eau distillée).

R2 : Réactif 2 : RVV (activateur)

Enzyme hautement purifiée extraite du venin de vipère Rusasil RVV, lyophilisée en présence de calcium, et stabilisée, capable d'activer spécifiquement le Facteur X en FXa en présence de calcium. 4 flacons (à reconstituer par 2,5 ml d'eau distillée).

R3 : Réactif 3 : Tampon Tris-NaCl

Tampon Tris-NaCl, 10 fois concentré, contenant de l'acide de sodium. À diluer 10 fois en eau distillée avant utilisation. 4 flacons d'environ 5 ml.

Précautions :

- Le plasma doit être utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.
- Le tampon R3 contient de faibles quantités d'acide de sodium (0,1 g/l de NaOH), qui peuvent générer des composants exploités au contact des condensateurs en plomb ou en cuivre. Pour éviter ce risque, effectuer des lavages intensifs.
- Toute précaution doit être prise pour éviter tout risque d'injection et d'introduction accidentelles de R1 ou R2 dans l'opercule. En cas de contact avec la peau, laver abondamment à l'eau. En cas de contact avec une plaie, contacter un service médical compétent en précisant la nature et l'origine biologique du produit.
- Le taux de RVV peut varier de lot à lot et est ajusté exactement pour chaque lot de réactif, afin d'obtenir une reproductibilité homogène de lot à lot.

REACTIFS ET MATERIELS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

Reactifs :

- Eau distillée, stérile de préférence.
- Acide acétique (20%) ou acide citrique 2% (méthode en point final)
- Plasmas de calibration et de contrôle qualité, titrés en Facteur X (ex. Biophen Plasma Calibrator réf 222101, Biophen Normal Control Plasma réf 225201, Biophen Abnormal Control Plasma réf 223001).

Matériels :

- Spectrophotomètre ou estimateur pour dosages chromogéniques, à 405 nm.
- Chronomètre.
- Pipettes calibrées.

CONSERVATION :

Les réactifs non encore utilisés doivent être conservés à 2-8 °C, dans leur coffret d'origine. Ils sont alors stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

R1 : Réactif 1 : Substrat chromogénique spécifique du Facteur Xa (5Xa-11)

- Reconstituer chaque flacon par exactement 2,5 ml d'eau distillée. Bien agiter lors de la reconstitution jusqu'à dissolution complète.
- Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, avant utilisation, en agitant de temps en temps.
- Bien homogénéiser avant utilisation.

Stabilité du substrat reconstitué, conservé dans son flacon d'origine :

- 1 mois à 2-8°C
- 3 jours à température ambiante (18-25°C)
- 1 mois congelé à -20°C (avant utilisation, décongeler pendant 15 min. dans un bain marie à 37°C)

R2 : Réactif 2 : RVV

- Reconstituer chaque flacon par exactement 2,5 ml d'eau distillée, bien homogénéiser.
- Laisser stabiliser 30 min. à température ambiante (18-25°C), en agitant de temps en temps.
- Bien homogénéiser avant utilisation.

Stabilité du flacon reconstitué, conservé dans son flacon d'origine :

- 1 semaine à 2-8°C
- 3 jours à température ambiante (18-25°C)
- 1 mois congelé à -20°C (avant utilisation, décongeler pendant 15 min. dans un bain marie à 37°C)

R3 : Réactif 3 : Tampon Tris-NaCl

Tampon 10 fois concentré (5 ml par flacon). Agiter le flacon et diluer la solution au 1/10 en eau distillée. Les 5 ml de solution concentrée permettent de préparer 50 ml de tampon après dilution. Après ouverture, le flacon est stable 4 semaines à 2-8°C, à l'abri de toute contamination. Le tampon dilué peut être utilisé jusqu'à 7 jours après préparation, lorsqu'il est protégé de toute contamination et conservé à 2-8°C. Agiter avant emploi.

Précautions :

- Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, réformer les flacons après usage, avec leurs bouchons respectifs (jaune pour le substrat (R1), capsule blanche pour le réactif activateur avec RVV (R2), et bouchon blanc pour le tampon (R3)).
- Manipuler les réactifs avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination.
- Si le substrat jaunit, cela indique la présence d'une contamination. Il doit être rempli d'un nouveau flacon qui doit être utilisé.
- La stabilisation des flacons pendant 30 min. à TA, après reconstitution, permet d'obtenir une reactivité homogène et stable dans le temps.
- Afin d'éviter l'évaporation des réactifs pendant leur utilisation, limiter au maximum la zone de chargement en utilisant, par exemple, des cheminées plastiques enroulées sur les capsules operculées.

Nota :

- Les flacons R1 et R2 sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte de produit à l'ouverture du flacon.
- Sauf si la méthode automatisée est utilisée, les réactifs peuvent être reconstitués avec des volumes différents de ceux indiqués. Dans tous les cas, les rapports respectifs de chaque réactif R1 et R2, pré-mélangés dans la méthode manuelle (concentration finale dans le milieu réactionnel et volume total), doivent être respectés.
- Utiliser séparément les réactifs d'un même lot de coffrets. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage. Les réactifs R1 et R2 sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être exploités à température ambiante, sans aucun dommage.

PREPARATION DES PLASMAS :

Le sang (9 volumes) doit être collecté, en tube plastique ou en verre silicé contenant du citrate trisodique 0,105M (1 vol.), par ponction veineuse fraîche, en évitant toute activation. Rejeter les premières gouttes de sang.

- Centrifuger le prélèvement, dans les 4 heures suivantes, pendant 20 minutes à 3000g, à une température inférieure ou égale à 18°C. Le plasma citraté doit être décanté dans un tube plastique.
- Conservation du plasma
 - 8 heures à température ambiante (18-25°C)
 - 24 heures à 2-8°C
 - 1 mois congelé à -20°C ou moins (avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 min. dans un bain marie à 37°C)

Se référer au document H21-A2 du NCCLS pour de plus amples informations sur la collecte, le transport et la conservation des échantillons.

PROCEDURE :

Le coffret Biophen Factor X est utilisé en méthode colorimétrique, automatisée, et peut être également utilisé en méthode manuelle, en « point final ». Les adaptations sur automates sont disponibles sur demande. Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est évaluée à 405 nm.

ETALONNAGE :

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'un plasma calibrateur, de concentration (C) en Facteur X précisément définie, ou d'un pool de plasma citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connue, qui par définition tire 100% de Facteur X).

Le dosage implique une dilution du plasma au 1/10, qui représente par définition le taux 100% de Facteur X. La gamme d'étalonnage va de 0 à 200% de Facteur X.

La dilution du plasma au 1/5 correspond à un taux de 200%.

Pour un calibrateur titrant C, le taux de 200% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant ce calibrateur par le facteur suivant : 5 x (C) / 100.

D750-01/BI/1705

A partir de cette solution faire la gamme d'étalonnage suivante dans le tampon de dilution (R3) préalablement dilué au 1/10 en eau distillée.

% FX	Etalon C=200% FX (µl)	Tampon dilué (R3) (µl)
0	0	500
50	125	375
100	250	250
200	500	0

MODE OPERATEUR :

Méthode manuelle :

Diluer les échantillons et les contrôles au 1/10 en tampon de dilution (R3) préalablement dilué au 1/10 en eau distillée.

Dans le puits d'une microplaque ou dans un tube **plastique** incubé à 37°C, introduire :

Réactifs	Microplaque	Tube plastique
Plasma ou contrôle dilué au 1/10 ou étalon	50 µl	200 µl
Incuber à 37°C, pendant 1 à 2 minutes puis introduire :		
R1 : Substrat Ska 11-Préincubé à 37°C	50 µl	200 µl
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 1 à 2 minutes puis introduire :		
R2 : RVV, Préincubé à 37°C	50 µl	200 µl
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 2 minutes exactement		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (20g/l)	50 µl	200 µl
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

La couleur jaunée obtenue est stable pendant 2 heures.

Le blanc d'échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse de celui du test : Acide Citrique (20g/l), RVV, substrat Ska-11, plasma dilué.

Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance obtenue pour le test.

Méthode automatisée :

Les adaptations sur les divers automates présents sur le marché sont disponibles sur demande. Pour toute adaptation, les rapports respectifs des réactifs et du plasma testé, et le protocole général de la méthode manuelle doivent être respectés.

Nota : Suivant les méthodes, si des valeurs plus ou moins importantes doivent être utilisées, respecter très soigneusement le rapport des volumes et des concentrations des différents réactifs constituant le mélange réactionnel. Faire un blanc plasma si le plasma est citrique, hépariné, hémopé ou présente une coloration à l'échelle des plasmas étalons.

CONTRÔLE DE QUALITÉ :

L'utilisation de plasmas de contrôle, titrés en Facteur X, permet de valider la courbe d'étalonnage et la reproductibilité du dosage, dans les différentes séries, pour un même lot de réactifs. La courbe d'étalonnage est valide lorsque les concentrations obtenues pour les contrôles entrent dans la zone d'acceptation.

Différents plasmas de contrôle sont disponibles : Biophen Normal Control Plasma (réf 223202) et Biophen Abnormal Control Plasma (réf 223301). La valeur cible et le **domaine d'acceptation** en Facteur X devront être vérifiés dans les conditions de travail exactes du laboratoire pour chaque lot.

Nota :
 - Une nouvelle courbe d'étalonnage doit être effectuée à chaque changement de lot de réactif, après toute modification importante de l'analyseur, et lorsque les résultats des contrôles de qualité ne sont pas dans les valeurs attendues pour la méthode.
 - Chaque laboratoire peut établir son propre domaine d'acceptation, en fonction des protocoles et des instruments utilisés.
 - Insérer au moins un contrôle de qualité (à différents niveaux) dans chaque série de dosages réalisés.

LIMITES DU DOSAGE :

- Aucune interférence significative n'a été observée sur le dosage jusqu'à 10U/ml d'héparine dans le plasma.
 - La présence d'anticorps anti-Facteur X dans le plasma peut interférer sur le dosage.
 - Pour obtenir les performances optimales du coffret, suivre scrupuleusement les instructions techniques.

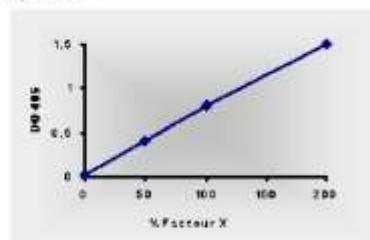
RESULTATS :

• Pour la méthode en point final, tracer sur papier millimétré, la droite étalon en portant en ordonnées la DO à 405 (DO405) et en abscisses le taux de Facteur X (%).
 • La concentration de Facteur X dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en %.
 • En technique automatisée, les taux sont directement calculés par l'instrument en fonction des valeurs de l'étalonnage.
 • La zone de mesure va de 5 à 200 %.
 Si la dilution utilisée est 1/10, le taux de Facteur X est obtenu directement sur la courbe.
 Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu est le taux mesuré, multiplié par le facteur de dilution « D » utilisé et divisé par 10, soit $D/10$.

Les résultats obtenus doivent être utilisés à des fins de recherche uniquement et ne sont pas utilisables pour le diagnostic ou le traitement du patient.

EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE :

La courbe d'étalonnage ci-dessous est donnée à titre d'exemple. N'utiliser que la courbe générée pour la série de dosages réalisés.



VALIDITE DE L'ETALONNAGE :

La courbe d'étalonnage est valide lorsque la linéarité est conforme ($r^2 \geq 0,98$) et que les concentrations obtenues pour les contrôles correspondent à la zone d'acceptation.

PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES :

- La limite de détection est déterminée en mesurant sur la courbe d'étalonnage le « taux apparent » de Facteur X, correspondant à la DO moyenne obtenue pour un échantillon sans Facteur X incrimé de 3 écart-types. Cette limite de détection est de < 5%.
- Exemple de reproductibilité obtenue avec des plasmas à des taux variables de facteur X sur la zone de mesure (méthode manuelle).

Echantillons	Taux de FX %	CV inter essais %	N
Echantillon 1	101	5,4	6
Echantillon 2	58	5,4	6

- Le dosage Biophen Factor X présente une bonne corrélation avec le dosage du facteur X par méthode coagulante, réalisé en méthode manuelle. $Y = 0,67 X$, $r = 0,98$.
- Le dosage est strictement spécifique du Facteur X dans les conditions décrites (utilisation de venin de vipère Russell dont l'action est spécifique du facteur X, absence de phospholipides dans le test, présence d'inhibiteurs spécifiques de la thrombine (thromine) et de l'héparine (polybéne)).

BIOCHIMIE :

Le Facteur X de la coagulation, ou facteur Stuart, est un facteur vitamine-K dépendant d'environ 59 kD, synthétisé dans le foie. Il est présent à une concentration d'environ 10µg/ml dans le plasma, largement variable selon les individus.

Le Facteur X peut être activé par les voies intrinsèque ou extrinsèque de la coagulation. En présence de calcium et de phospholipides, en association avec le Facteur V, le FXa forme un complexe capable d'activer la prothrombine en thrombine.

REFERENCES :

1. "Determination of vitamin K sensitive coagulation factors in plasma. Studies on three methods using synthetic chromogenic substrates", Bergstrom K and Egbreg N, Thromb. Res., 12 531-547, 1978.
2. "Activation of decarboxy factor X by a protein from Russell's viper venom. Purification and partial characterization of activated decarboxy factor X", Lindhout M, Kop-Klaassen DHM, Hemker MC, Biochim. Biophys. Acta, 533:327-341, 1978.
3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/> Coagulation factor X* (+227600).

DA CUNHA Marjorie

**DOSAGE DES FACTEURS DE COAGULATION VITAMINE K
DEPENDANTS CHEZ LE CHIEN : DEVELOPPEMENT, VALIDATION
ET INTERÊTS CLINIQUES.**

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 30 octobre 2018

RESUME :

Contrairement aux méthodes disponibles en médecine humaine, les tests d'exploration de l'hémostase en médecine vétérinaire sont plutôt limités d'un point de vue sensibilité, spécificité et précocité diagnostique et reposent le plus souvent sur une exploration globale d'une voie, telle la mesure des temps de coagulation. Notre étude expérimentale a consisté à développer et valider chez le chien une méthode de dosage chromogénique sur automate de chaque protéines vitamine K dépendantes que sont les facteurs de coagulation II, VII, IX et X ; à établir des intervalles de référence pour ces paramètres dans cette espèce ; et à réaliser une première approche de l'intérêt clinique de tels dosages. La méthode développée s'est révélée fiable, linéaire, reproductible et capable de montrer des différences significatives de niveau d'activité des facteurs en intra et inter espèce : activité plus importante des facteurs VII et X dans l'espèce canine ; activité du facteur II significativement plus importante chez la chienne ; activité du facteur X environ deux fois supérieure chez le chien comparé à l'homme. L'intérêt clinique s'est quant à lui révélé prometteur au regard des changements d'activité mis en évidence dans des contextes pathologiques en lien avec des anomalies des facteurs II, VII, IX et X.

Une utilisation en routine semble donc envisageable, dans les domaines de la recherche et de la clientèle notamment, permettant une approche plus fine de l'hémostase, notamment dans des contextes de coagulopathies d'origine héréditaire, d'état de déficience en vitamine K ou en γ -carboxylation, ou encore d'état d'hyper ou d'hypocoagulabilité.

MOTS CLES :

-Protéines vitamine K dépendantes - Intérêt clinique
-Chien - Intervalle de référence
-Dosage

JURY :

Président : Monsieur le Professeur François MION

1er Assesseur : Madame le Docteur Emilie KRAFFT
2ème Assesseur : Monsieur le Professeur Etienne BENOIT
Membre invité : Madame la Professeure Virginie LATTARD

DATE DE SOUTENANCE : 30 octobre 2018