



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>  
Eprints ID : 12263

**To cite this version :**

Rocher, Clément. *Particularités des intervalles de référence de la lipase, de la lipase spécifique pancréatique canine (CPLI) et de l'immunoréactivité de la trypsine et du trypsinogène (TLI) chez le dogue de Bordeaux*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 103 p.

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

# **PARTICULARITÉS DES INTERVALLES DE RÉFÉRENCE DE LA LIPASE, DE LA LIPASE SPÉCIFIQUE PANCRÉATIQUE CANINE (CPLI) ET DE L'IMMUNORÉACTIVITÉ DE LA TRYPSINE ET DU TRYPSINOGENÈ (TLI) CHEZ LE DOGUE DE BORDEAUX**

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

*par*

**ROCHER Clément**

Né, le 5 juillet 1988 à DECINES-CHARPIEU (69)

---

**Directeur de thèse : M. Olivier DOSSIN**

---

**JURY**

PRESIDENT :

**M. Jean-Pierre VINEL**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**M. Olivier DOSSIN**

**Mme Rachel LAVOUE**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE





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

**Directeur** : M. Alain MILON

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1<sup>o</sup> CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2<sup>o</sup> CLASSE**

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

## PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

## MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

## MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie* **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

## MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

## ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

## REMERCIEMENTS

**A Monsieur le Professeur Jean-Pierre VINEL**

Doyen de la Faculté de Médecine de Toulouse-Purpan

Professeur des Universités

Hépatogastro-entérologie

Qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse.

Hommages respectueux.

\*\*\*

**A Monsieur le Docteur Olivier DOSSIN**

Maitre de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores

Qui a accepté d'encadrer cette étude et de nous guider dans la réalisation de ce travail.

Qu'il trouve ici toute l'expression de notre reconnaissance.

\*\*\*

**A Madame le Docteur Rachel LAVOUE**

Maitre de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores

Qui nous a proposé ce sujet, qui a bien voulu nous aider dans la réalisation de cette étude, et qui nous fait l'honneur de prendre part à ce jury de thèse.

Sincères remerciements.





A **Papa** et **Maman**, pour l'éducation que vous m'avez donnée. Pour m'avoir guidé et accompagné tout au long de ces années, pour votre soutien continu dans la réalisation de mon rêve d'enfant. Ces quelques lignes sont bien peu de choses à côté de tout l'amour que j'ai pour vous.

A **Vincent**, mon petit frère, pour m'avoir supporté depuis le plus jeune âge et pour tous nos souvenirs d'enfance. Même si on se le dit trop peu tu comptes énormément pour moi.

A mes anges gardiens partis trop tôt,

A **Papy**, j'ai aujourd'hui une pensée émue pour toi.

A **Mamy**, pour ta générosité et ton amour.

A **Pépé**, pour toutes ces valeurs que tu m'as transmises.

A **Mémé**, pour ta gentillesse et ton amour. Pour toutes les vacances à Saint-Marc et le secret des fruits déguisés.

A **Jérôme**, mon parrain, pour tous ces moments passés ensemble. Pour ton optimisme à toute épreuve.

A **Cécile**, ma marraine, et **Didier**, pour votre soutien, votre générosité et tous ces weekends partagés durant ces 5 années. A **Camille** et mon filleul **Maxime**, « les petits », que j'ai vu grandir et avec qui je prends toujours autant de plaisir à jouer et à bricoler.

A **Edith**, **René**, **Claire**, **Cédric**, **Clémence** et **Louise**, pour votre accueil et votre présence depuis mon arrivée dans le Sud-Ouest.

A mes cousins, cousines, tantes, oncles et tous les autres membres de ma famille. Tous les moments passés ensemble sont précieux.

\*\*\*

A mes amis,

**Dédé**, pour avoir tenté d'organiser ma disparition en Sierra de Guara ; on pouvait s'en douter, ce fut un échec ! **Camille**, mon ange gardien de boum, **Chachou**, notre voyage au Mexique fut une expérience inoubliable. **Chloé**, ma sombrera, colocataire de la cité, partenaire de commérages et de révisions sur Skype, **Tifenn**, ton manteau de boum m'a tenu chaud toutes ces années. **Félix**, pour toutes ces randonnées superchampions, pour cette expérience typiquement atypique : la nuit en cabane en plein hiver et pour ta patience au tarot et à la belotte.

A tous les gratinés du Jungle Touch, chez qui j'ai fini par élire domicile après avoir parasité la maison quelques années. **Florent**, tes cheveux coiffés-décoiffés-mais-j'ai-pas-mis-de-gel et ton rictus inimitable ; Chauvet du gauche ? **Sarah-chou**, pour nos défis culinaires souvent réussis. **Dido**, pour ton déguisement noix de coco adaptable à n'importe quel thème de soirée. **Fanny**, partie conquérir l'Amérique du Sud. **Samy** et ses tisanes, infusions ou décoctions en tous genres. **Flora**, non les pions blancs ne resteront pas dans la boîte de Catane ! **Delphine**, pour ta spontanéité et **Enrico**, notre boulanger italien préféré. Et enfin **Guillaume**, les protéines c'est la vie. A **Doug**, **Pok** et **Goya** qui ont partagé notre quotidien.

A mes docs, **Angel**, **Benoît**, **Thomas**, **Clémence**, **Marion**, **Pauline**, **Yoann**, **Laure**, **Marie** et **Claire**, pour cet intense accueil.

A mes poulots, **Gwen**, **Polidori**, **Coucouch**, **J-B**, **Froidefond**, **Ciska**, **Fanny**, **Manon**, et **Estelle**, position Paint-ball ?

A **Emilie**, **Myriam** et **Julien**, partenaires d'organisation de conférences et de buffets.

Aux joyeux lurons du bled, **Antoine**, **Guillaume**, **Hugo** et **Salim**. A **Pauline**, **Sophie**, **Thibault**, **Caro**, **Florian**, **Tiffany**, **Bibo**, **Sandra**, **Maëlle**, et tous mes copromos.

A **MBB** et **Laeti** mes voisines de choc, **Crobic**, **Perrinos**, **Paul** et **Franck**, **Kévin**, **Perle**, **Virginie**, **Marion**, **Simon**, **Aude**, et tous ceux qui ont fait de ces 5 années de cours en amphi, de cliniques et de boums une série de moments inoubliables.

Au **Staff Revue 2013**, pour nos réunions sans fin et notre sketch au plus haut niveau !

Aux anciens de la prépa Descartes, **Elise, Adélie, Diane, Charles, Camille, Poyet, Raphaël et Julien** pour nos vacances, pour RLP, les week-ends de retrouvailles estivales en toutes saisons et tous nos délires de plus de vingt minutes. Sans oublier tous ceux qui ont rendu ces trois années de galère, de stress, de DS, de khôlles et de sorties géol' plus faciles à vivre et finalement pas si désagréables que cela.

A la Team Fougis, **Pierre, Guillaume et Laure, Lorraine, Anne-So, Blanche, Tanguy, Marc, Manon, Mao, Dom et Youyou**, pour toutes nos soirées, les « Sessions Fougis » et les premiers de l'an tous plus délicieusement for-mi-dables les uns que les autres.

Aux rameurs du Tours Aviron Club, **Thibault, Simon, Jérôme, Olivier, Kévin, Nicolas, Samuel, Quentin, Alex, Cédric, Négro, Marie, Maëlle, Delphine, Mélanie, Laetitia** et bien sûr **Laurent, Peloch', Sam et Olivier**, les coachs qui ont su me faire donner le meilleur de moi-même.

A **Juju, Tiwill, Fried et Mainger**, pour nos soirées clandestines et les sirops de cerise plus plus à la Cabane. Le temps confirme notre amitié.

To all the Scottish guys I met during my semester in Edinburgh, especially **Emma, Adele, Laura, Sarah, Sophie, Marc, Ollie, Joe and Michael**, the best group ever! And **Adrian, Josh, Cameron, Ian, Dani, Nic, Caroline, Erin, Erin number 2, Susan, Perry and David** for all these good moments. To **Gillian**, my wonderful flatmate.

A **Orphée** qui nous a accompagnés partout toutes ces années et à **Igor** qui partage maintenant notre quotidien.

A tous ceux qui comptent pour moi et qui se reconnaîtront, merci d'avoir partagé quelques instants de votre vie avec moi.



## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	7
TABLE DES MATIERES.....	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	17
TABLE DES ABREVIATIONS.....	19
INTRODUCTION.....	21
<b>PARTIE 1: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>23</b>
1. INTERET ET METHODE DE DETERMINATION D'UN INTERVALLE DE REFERENCE EN BIOLOGIE MEDICALE.....	25
1.1. <i>Définitions</i> .....	25
1.1.1. Individu et population de référence.....	25
1.1.2. Valeur et intervalle de référence.....	26
1.2. <i>Méthode de détermination d'un intervalle de référence</i> .....	26
1.2.1. Choix de l'échantillon de référence.....	27
1.2.2. Facteurs de variation pré-analytiques et analytiques.....	27
1.2.3. Réalisation des prélèvements.....	28
1.2.4. Analyse des résultats.....	28
1.3. <i>Intervalles de référence spécifiques de races canines</i> .....	29
2. BIOMARQUEURS ET CARACTERISTIQUES D'UN TEST DIAGNOSTIQUE.....	30
2.1. <i>Définition d'un biomarqueur</i> .....	30
2.2. <i>Intérêt des biomarqueurs dans une démarche diagnostique</i> .....	30
2.3. <i>Caractéristiques et critères de choix d'un test diagnostique</i> .....	31
2.3.1. Sensibilité et spécificité d'un test diagnostique.....	32
2.3.2. Valeur prédictive positive et valeur prédictive négative.....	34
2.3.3. Application à l'étude du pancréas exocrine.....	35
3. BIOMARQUEURS DE L'EXPLORATION DE LA CYTOLYSE DU PANCREAS CHEZ LE CHIEN.....	36

3.1. Place des biomarqueurs de cytolysse pancréatique dans l'étude du pancréas exocrine .....	36
3.2. Activités enzymatiques de la lipase conventionnelle (LC) et de l'amylase .....	38
3.2.1. Activité enzymatique de la LC .....	38
3.2.1.1. Origine des lipases .....	38
3.2.1.2. Facteurs de variation de l'activité de la LC .....	39
3.2.1.3. Performances diagnostiques de l'activité de la LC pour les pancréatites .....	40
3.2.2. Activité enzymatique de l'amylase .....	42
3.2.2.1. Origine de l'amylase .....	42
3.2.2.2. Facteurs de variation de l'activité de l'amylase .....	42
3.2.2.3. Performances diagnostiques de l'activité de l'amylase pour les pancréatites .....	43
3.3. Concentration en Immunoréactivité de la lipase pancréatique canine (cPLI) .....	44
3.3.1. Développement et validation des tests cPLI .....	44
3.3.1.1. Isolement de la lipase spécifique du pancréas .....	44
3.3.1.2. Développement et validation des tests originaux .....	45
3.3.1.3. Développement de validation du Spec cPL .....	45
3.3.1.4. Développement et validation du test rapide SNAP cPL .....	46
3.3.2. Facteurs de variation de cPLI .....	47
3.3.3. Performances diagnostiques du dosage de cPLI dans le cadre des pancréatites chez le chien .....	49
3.4. Immunoréactivité de la trypsine et du trypsinogène (TLI) .....	52
3.4.1. Un test d'exploration fonctionnelle du pancréas .....	52
3.4.2. Facteurs de variations de TLI .....	52
3.4.3. Performances diagnostiques de TLI pour le diagnostic des pancréatites .....	53
3.5. Biomarqueurs utilisés de façon plus marginale pour l'exploration du pancréas exocrine .....	53
3.5.1. Elastase-1 pancréatique .....	53
3.5.2. Peptide d'activation du trypsinogène (TAP) .....	55
3.5.3. Complexes inhibiteurs de la Trypsine .....	55

3.5.3.1. L'inhibiteur- $\alpha$ 1 de la trypsine .....	56
3.5.3.2. L' $\alpha$ 2-Macroglobuline.....	56
3.5.4. Marqueurs non-sanguins de l'exploration du pancréas exocrine.....	57
3.5.4.1. Ratio TAP:créatinine urinaire.....	57
3.5.4.2. Mesure de la LC dans fluide péritonéal .....	57
3.6. Conclusion.....	58
<b>PARTIE 2: ETUDE CLINIQUE .....</b>	<b>59</b>
1. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	61
2. MATERIELS ET METHODE .....	63
2.1. <i>Protocole expérimental</i> .....	63
2.2. <i>Constitution de l'échantillon de référence</i> .....	63
2.2.1. Recrutement des animaux.....	63
2.2.2. Critères d'inclusion .....	64
2.2.3. Critères d'exclusion .....	64
2.3. <i>Réalisation des prélèvements sanguins</i> .....	65
2.4. <i>Analyses biochimiques</i> .....	66
2.4.1. Dosage de l'activité de la LC .....	66
2.4.2. Mesure quantitative de la concentration en cPLI .....	66
2.4.3. Mesure de TLI .....	67
2.5. <i>Traitement statistique des données</i> .....	67
3. RESULTATS .....	69
3.1. <i>Caractéristiques de l'échantillon de référence</i> .....	69
3.2. <i>Description de la distribution des valeurs obtenues</i> .....	70
3.3. <i>Calculs de la corrélation entre les couples de variables</i> .....	71
3.3.1. Etude de la corrélation entre la LC et cPLI .....	71
3.3.2. Etude de la corrélation entre la LC et TLI .....	72
3.3.3. Etude de la corrélation entre cPLI et TLI .....	73
3.4. <i>Détermination des limites des intervalles de références</i> .....	73
3.4.1. Détection et suppression des valeurs considérées comme aberrantes	73

3.4.2. Détermination des limites de l'intervalle de référence spécifique de cPLI .....	74
3.4.1. Détermination des limites de l'intervalle de référence spécifique de TLI .....	74
4. DISCUSSION .....	76
CONCLUSION .....	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	85
ANNEXES .....	91



## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### Table des Tableaux

Tableau 1 : Comparaison du type de réponse, avantages et inconvénients entre un examen de référence (Gold Standard) et un test diagnostique .....	32
Tableau 2 : Tableau de contingence d'un échantillon de N sujets classés en fonction de leur état de santé selon une méthode de référence et le test étudié.....	33
Tableau 4 : Caractéristiques de l'échantillon de référence : sexe .....	69
Tableau 5 : Caractéristiques de la distribution des données brutes chez 90 DDB cliniquement sains (minimum, médiane et maximum) .....	70
Tableau 6 : Intervalles de référence des marqueurs cPLI et TLI chez le DDB .....	75

### Table des Figures

Figure 1: Distribution des valeurs de cPLI .....	70
Figure 2: Distribution des valeurs de TLI .....	71
Figure 3: Représentation graphique des valeurs de cPLI en fonction des valeurs de Lipase ..	72
Figure 4: Représentation graphique des valeurs de TLI en fonction des valeurs de Lipase ....	72
Figure 5: Représentation graphique des valeurs de TLI en fonction des valeurs de cPL.....	73
Figure 6 : Histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne pour le cPLI .....	102
Figure 7 : Histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne pour le cPLI, après exclusion des valeurs aberrantes .....	102
Figure 8 : Histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne pour le TLI.....	103
Figure 9 : Histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne pour le TLI, après exclusion des valeurs aberrantes .....	103



## TABLE DES ABREVIATIONS

<b>°C</b>	Degré Celsius
<b>µL</b>	Microlitre
<b>µg/L</b>	Microgramme par litre
<b>1,2 DiG</b>	1,2-diglycérade
<b>ASVCP</b>	American Society for Veterinary Clinical Pathology
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory and Standards Institute
<b>cPL</b>	Lipase spécifique pancréatique canine
<b>cPLI</b>	Immunoréactivité de la lipase spécifique pancréatique canine
<b>DDB</b>	Dogue de Bordeaux
<b>DGGR</b>	1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin)-ester
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FN</b>	Faux négatif
<b>FP</b>	Faux positif
<b>IEP</b>	Insuffisance exocrine pancréatique
<b>IFCC</b>	Federation of Clinical chemistry and Laboratory Medicine
<b>IR</b>	Intervalle de référence
<b>LC</b>	Lipase conventionnelle
<b>ng/mL</b>	Nanogramme par millilitre
<b>Pr</b>	Probabilité pré-test
<b>Se</b>	Sensibilité
<b>Sp</b>	Spécificité
<b>TAP</b>	Peptide d'activation du trypsinogène
<b>TLI</b>	Immunoréactivité de la trypsine et du trypsinogène
<b>UI/L</b>	Unité Internationale par litre
<b>VN</b>	Vrai négatif
<b>VP</b>	Vrai positif
<b>VPN</b>	Valeur prédictive négative
<b>VPP</b>	Valeur prédictive positive



## INTRODUCTION

L'interprétation des tests de laboratoire fait appel à un intervalle de référence (IR) pour guider la démarche du vétérinaire qui l'emploie. Aujourd'hui, la majeure partie des IR utilisés sont ceux fournis par les laboratoires à l'origine des tests. Compte tenu de l'immense variabilité génétique, morphologique et physiologique présente dans l'espèce canine, l'utilisation d'IR inadaptés peut conduire à l'obtention de résultats faussement négatifs ou faussement positifs.

Le Dogue de Bordeaux (DDB) est chien de type molossoïde. Connaissant la prédisposition raciale des DDB pour une glomérulonéphropathie juvénile familiale et son impact potentiel sur les analytes biochimiques et les indices hématologiques [27], deux récentes études se sont intéressées à définir leurs intervalles de référence chez cette race [28, 29]. Il est alors apparu que 75% des animaux présentaient des valeurs de lipase conventionnelle (LC) nettement augmentées par rapport à la limite supérieure de l'IR de l'analyseur utilisé pour cet analyte (jusqu'à 3 fois la valeur). Devant une telle augmentation de la LC, il a été décidé de documenter plus précisément la fonction pancréatique grâce à la lipase spécifique pancréatique canine (cPL) et l'immunoréactivité de la trypsine et du trypsinogène (TLI) qui sont des marqueurs plus spécifiques de cet organe et de définir leurs intervalles de référence pour cette race.

Ce travail comporte une synthèse bibliographique reprenant l'intérêt des intervalles de référence et des tests diagnostiques des marqueurs de cytolyse pancréatique d'une part et une étude clinique chez le DDB aboutissant à la définition des limites des IR spécifiques de cette race pour cPLI et TLI d'autre part.



# **Partie 1: Synthèse bibliographique**





# 1. INTERET ET METHODE DE DETERMINATION D'UN INTERVALLE DE REFERENCE EN BIOLOGIE MEDICALE

L'utilisation d'examens de biologie médicale tient une place importante dans la démarche diagnostique du vétérinaire et le suivi des fonctions biologiques d'un organisme. De manière générale, ces tests mettent en œuvre des réactions chimiques ou immunologiques et fournissent un résultat chiffré. Pour être interprétés, les résultats doivent être confrontés à un IR. Ces intervalles représentent l'étendue des valeurs considérées comme physiologiques que peut prendre la variable chez un animal sain. C'est pourquoi l'utilisation d'IR inadaptés peut conduire à des résultats erronés et compromettre la décision clinique du vétérinaire. En général le vétérinaire dispose de l'IR établi par le fabricant du test et ne dispose que de très peu d'information sur la population à partir de laquelle cet IR a été établi. Des recommandations internationales sont proposées sur le sujet par l'International Federation of Clinical chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) et le Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) en médecine humaine [9]. L'American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) en propose une adaptation pour la médecine vétérinaire [14].

## 1.1. Définitions

Afin de bien définir le concept d'IR, quelques définitions établies par le CLSI vont être rappelées de façon succincte [9].

### 1.1.1. Individu et population de référence

Un *individu de référence* est un individu en bonne santé dont la sélection fait appel à des critères définis précisément. Le plus difficile est alors de définir la bonne santé d'un individu. Ceci passe par la définition de critères d'inclusion et d'exclusion.

Une *population de référence* est l'ensemble des individus de référence sélectionnés sur la base de critères d'inclusion et d'exclusion. Cette population n'est en générale pas accessible, en revanche, il est plus aisé d'avoir accès à un *échantillon de référence*, qui est une partie représentative de la population de référence. Il est alors possible par la suite d'étendre les résultats obtenus à la population de référence.

### 1.1.2. Valeur et intervalle de référence

Une *valeur de référence* est la valeur isolée obtenue pour une variable spécifique, mesurée chez un individu de référence. L'ensemble des valeurs de référence chez chacun des individus de référence constitue la distribution de référence de la variable.

Un *intervalle de référence* est l'intervalle des valeurs de référence dont les bornes inférieure et supérieure sont respectivement les limites de référence inférieure et supérieure. Ces valeurs correspondent en général aux 2.5<sup>ème</sup> et 97.5<sup>ème</sup> percentiles de la distribution. Un IR contient donc seulement 95% des valeurs de référence. Cinq pour cent des individus de référence ont ainsi une valeur de référence en dehors de cet intervalle.

## **1.2. Méthode de détermination d'un intervalle de référence**

Les organismes internationaux cités précédemment (IFCC, CLSI, ASVCP) recommandent différentes méthodes pour la détermination des IR. Compte tenu de son utilisation dans la suite de ce travail, seule la méthode de détermination d'un IR *de novo* est détaillée dans les paragraphes suivants. A titre d'information, il existe des méthodes de détermination à partir d'une base de données dites *a posteriori*, de transfert d'un IR déjà établi, ou d'utilisation d'une population hospitalière [9, 14, 58].

La démarche de détermination d'un IR *de novo* est publiée par l'IFCC-CLSI dans la recommandation C28-A3 [9]. L'ASVCP en propose une adaptation pour la médecine vétérinaire comprenant 13 étapes [14]. Les différents points critiques de cette méthode sont détaillés ci-après.

### 1.2.1. Choix de l'échantillon de référence

Etape initiale de la détermination d'un IR, le choix de l'échantillon de référence est primordial et doit être fait de façon rigoureuse.

L'effectif de cet échantillon doit être adapté et permettre la réalisation des calculs des limites de référence et de leurs intervalles de confiance. Avec la méthode non paramétrique, un effectif minimum de 120 individus de référence est recommandé et permet de définir des intervalles de confiance à 90% [14, 57]. Toutefois, ce chiffre très élevé est souvent difficile à atteindre. Il est donc recommandé d'avoir le nombre d'individus de référence le plus grand possible. Avec un effectif de 40 individus de référence, on peut éliminer un individu à chaque extrémité de la distribution et conserver 95% des individus entre les 2.5<sup>ème</sup> et 97.5<sup>ème</sup> percentiles de la distribution et ainsi définir les limites de référence de l'IR avec la méthode non paramétrique. En revanche, diminuer l'effectif augmente l'imprécision des limites de références ainsi définies [14].

De plus, des critères d'inclusion et d'exclusion doivent être précisément détaillés afin de déterminer les caractéristiques de l'échantillon de référence. Ces critères biologiques, cliniques, géographiques ou médicaux, ont pour but de définir l'état de bonne santé et d'éviter l'introduction d'animaux malades dans l'échantillon de référence [14]. Idéalement, la composition de l'échantillon de référence est le reflet celle de la population en termes de sexe, d'âge, de mode de vie.

### 1.2.2. Facteurs de variation pré-analytiques et analytiques

Les facteurs de variation pré-analytiques regroupent des facteurs directement liés à la biologie des individus de référence (cycle sexuel, gestation, stress par exemple) ou à la technique de prélèvement des spécimens (site de prélèvement, contention de l'individu par exemple). Leur description doit donc être précise afin de donner des points de repère sur les conditions de détermination des IR. L'idéal est de pouvoir standardiser les procédures. Le document H03-A6 du CLSI donne les recommandations relatives au prélèvement sanguins en médecine humaine[8] adaptées par l'ASVCP pour la médecine vétérinaire [14].

Les facteurs de variation analytiques sont quant à eux directement liés à la technique d'analyse. La maîtrise de ces facteurs permet de limiter la variation du résultat qui ne serait pas imputable à la variabilité intra ou interindividuelle [14]. Il est donc important de préciser quels analyseurs ou tests sont mis en jeu et de décrire leurs caractéristiques techniques.

### 1.2.3. Réalisation des prélèvements

Les conditions de réalisation des prélèvements (préparation des animaux, lieu de prélèvement) sont un élément important dans la collecte des spécimens. De même la manipulation, le stockage et le traitement des spécimens doivent être détaillés. Pour cela, il est nécessaire d'établir un protocole standardisé au maximum, associé à une méthode de traçabilité des spécimens. Tout ceci est encadré par des recommandations fournies par l'IFCC-CLSI [9] et l'ASVCP [14].

### 1.2.4. Analyse des résultats

Avant de procéder à la détermination des limites de référence, il est nécessaire d'analyser les résultats obtenus. L'inspection visuelle de la distribution des valeurs se fait en général grâce à un histogramme de distribution des valeurs. Celle-ci permet d'étudier les valeurs extrêmes (outliers) afin de les éliminer si elles sont considérées comme aberrantes ou erronées. A l'heure actuelle, le CLSI recommande de s'orienter vers la conservation d'un maximum de valeurs plutôt que vers l'élimination d'un nombre important de valeurs considérées comme aberrantes [9]. Deux tests statistiques (méthode de Tukey et méthode de Dixon) peuvent être mis en œuvre pour l'identification de ces valeurs [9, 14]. Du fait de sa construction, la méthode de Dixon, permet de conserver plus de valeurs que la méthode de Tukey, ce qui va dans le sens des recommandations actuelles.

Enfin, la détermination des valeurs des limites de l'IR est réalisée, à l'aide de méthodes paramétriques si la distribution est normale ou symétrique ou sinon, par la méthode non paramétrique. Du fait de son utilisation dans la suite de ce travail, seule cette dernière est détaillée ici. Cette méthode classe les valeurs par ordre croissant et élimine 2.5% des valeurs à chaque extrémité de la distribution. Ensuite une interpolation est réalisée

entre les extrémités restantes et les valeurs supprimées. Comme cela a été montré précédemment, cette méthode peut être appliquée à partir d'un effectif de 40 individus de référence. Les intervalles de confiance des limites de référence sont alors calculés par une méthode bootstrap.

### **1.3. Intervalles de référence spécifiques de races canines**

De façon très générale, il existe en médecine vétérinaire des IR établis pour des paramètres de biologie médicale pour l'espèce canine. Aujourd'hui, de plus en plus d'équipes s'attachent à rechercher des spécificités et étudient l'intérêt des IR chez différentes races de chiens. Les études ont montré leur importance à la fois en hématologie et en biochimie canine [16, 44, 53, 56, 88, 92]. Il est alors apparu que certaines races possèdent des spécificités hématologiques et/ou biochimiques [5, 28, 29].

## **2. BIOMARQUEURS ET CARACTERISTIQUES D'UN TEST DIAGNOSTIQUE**

### **2.1. Définition d'un biomarqueur**

Un marqueur est défini comme une variable mesurée objectivement [31]. Lorsque la valeur de la variable utilisée est le résultat d'un dosage ou d'une mesure à partir d'un échantillon biologique, le terme de biomarqueur est utilisé [31]. Il permet d'évaluer un processus physiologique ou physiopathologique, ou la réponse d'un organisme à une intervention pharmacologique ou à une affection [31]. Dans le cas de l'étude présentée ici, la définition du biomarqueur sera limitée à des analytes pour partie directement dosables dans le sang et de façon plus marginale dosés dans d'autres fluides biologiques.

### **2.2. Intérêt des biomarqueurs dans une démarche diagnostique**

Les tests diagnostiques mettent en jeu des biomarqueurs et sont utilisés dans une démarche diagnostique comme examens complémentaires afin de réduire l'incertitude diagnostique du clinicien. Ils ne permettent pas d'établir un diagnostic avec certitude mais précisent la probabilité que le patient soit atteint ou non de l'affection suspectée. Le principal avantage de l'utilisation des biomarqueurs sanguins par rapport aux autres examens complémentaires classiquement mis en œuvre en médecine vétérinaire est qu'ils ne demandent aucune technicité particulière de la part du clinicien. Néanmoins, un étalonnage précis des kits de mesure, la recherche de valeurs de référence et la validation des résultats obtenus dans l'espèce étudiée sont nécessaires préalablement à une utilisation clinique.

La mise en œuvre de ces tests diagnostiques ne demande généralement qu'une prise de sang ; ceci en fait des tests non-invasifs. De plus, ils ne demandent en général que peu de manipulations et sont réalisables directement au chevet de l'animal. Cela les rend

particulièrement pertinents dans l'évaluation d'animaux cliniquement instables. Pour les tests les plus courants, le résultat est en général obtenu rapidement ; cependant le coût lié à la mise en œuvre de certains tests est variable par rapport aux autres examens complémentaires.

### **2.3. Caractéristiques et critères de choix d'un test diagnostique**

Le biomarqueur idéal doit permettre d'établir ou d'exclure un diagnostic d'affection de l'organe ciblé chez l'animal atteint, avec une sensibilité et une spécificité les meilleures possibles. La valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative sont deux autres caractéristiques qui permettent d'objectiver la qualité du test dans une démarche diagnostique. Ces quatre indices, exprimés en pourcentages, permettent de caractériser ses performances et d'apprécier l'importance à donner au résultat obtenu. Cependant, il est important de se rappeler que ces indices caractérisent les tests de façon imparfaite et ne permettent pas de les classer les uns par rapport aux autres [11].

Le tableau suivant (**Tableau 1**) compare le type de réponse, les avantages et les inconvénients pour un examen de référence (Gold Standard) et un test diagnostique.

**Tableau 1 : Comparaison du type de réponse, avantages et inconvénients entre un examen de référence (Gold Standard) et un test diagnostique**

	<b>Examen de référence (Gold Standard)</b>	<b>Test diagnostique</b>
<b>Réponse</b>	binaire (malade / non malade)	binaire (positif / négatif) probabilité (faible / moyenne / forte) quantitative (valeur discrète ou continue)
<b>Avantages</b>	incontestable	peu ou pas douloureux peu ou pas risqué peu coûteux disponible facilement
<b>Inconvénients</b>	inconfort, douleur Risques lors de la réalisation coûteux disponibilité	Imparfait

### 2.3.1. Sensibilité et spécificité d'un test diagnostique

La sensibilité et la spécificité d'un test sont les caractéristiques intrinsèques du test. Plus elles sont élevées plus le test est performant. Elles fournissent une information sur l'aptitude du test à fournir des résultats différents chez les animaux malades et sains.

La *sensibilité* (Se) est l'aptitude d'un test à fournir une réponse positive chez un animal atteint. Si la sensibilité est élevée on aura alors peu de faux-négatifs (FN), donc un résultat négatif aura de fortes chances d'être un vrai-négatif (VN). Un test très sensible est utile pour exclure la maladie lorsqu'il est négatif ; c'est donc une caractéristique importante des tests de dépistage.



La *spécificité* (Sp) est l'aptitude d'un test à fournir une réponse négative chez un animal indemne. Si la spécificité est élevée on aura alors peu de faux-positifs (FP), donc un résultat positif aura de fortes chances d'être un vrai-positif (VP). Un test très spécifique est utile pour confirmer la maladie lorsqu'il est positif.

Pour un test diagnostique donnant une réponse de type binaire, les résultats peuvent être résumés à l'aide d'un tableau de contingence (**Tableau 2**). Celui-ci permet ensuite de calculer les valeurs de sensibilité et de spécificité du test.

**Tableau 2 : Tableau de contingence d'un échantillon de N sujets classés en fonction de leur état de santé selon une méthode de référence et le test étudié.**

		Test étudié		Total
		positif	négatif	
Méthode de référence	Malades	VP	FN	VP + FN
	Non malades	FP	VN	FP + VN
Total		VP + FP	FN + VN	N

La sensibilité et la spécificité du test sont alors estimées respectivement par la proportion de vrais positifs chez les malades et par la proportion de vrais négatifs chez les non malades :

$$Se = \frac{VP}{VP + FN} \text{ et } Sp = \frac{VN}{VN + FP}$$

Pour un test à réponse quantitative, il est nécessaire de définir une valeur seuil pour différencier les sujets à réponse positive et négative. Cependant, comme il existe toujours une zone de chevauchement entre les résultats positifs et négatifs, la définition de la valeur seuil conduit à des erreurs de classification. La représentation graphique des caractéristiques intrinsèques du test par une courbe Receiver Operating Characteristic (ROC Curve) permet la détermination du meilleur seuil de positivité du test. En effet, cette courbe représente la sensibilité en fonction de la quantité (1 – spécificité) et permet de définir la valeur seuil qui

permet d'optimiser une caractéristique en conservant l'autre caractéristique la moins détériorée possible [11]. Pour un test donné, la sensibilité et la spécificité varient en sens inverse et selon la valeur seuil choisie ; ceci explique pourquoi la définition du seuil impose un compromis entre ces deux indices [11].

### 2.3.2. Valeur prédictive positive et valeur prédictive négative

Les valeurs prédictives positives et négatives sont des indices calculés en fonction des caractéristiques intrinsèques du test. Elles sont dépendantes de la prévalence de l'affection et de la probabilité pré-test. La probabilité pré-test est la probabilité que le sujet considéré ait la maladie avant de connaître le résultat du test diagnostique mis en jeu. Le tableau de contingence présenté précédemment (**Tableau 2**) permet également de calculer leur valeur.

La *valeur prédictive positive* (VPP) est la probabilité que l'animal soit réellement malade lorsque le test donne un résultat positif. Elle est définie par la formule suivante :

$$VPP = \frac{[Se * pr]}{[(Se * pr) + (1 - Sp) * (1 - pr)]} = \frac{VP}{VP + FP}$$

Où *pr* est la probabilité pré-test définie précédemment.

La *valeur prédictive négative* (VPN) est la probabilité que l'animal soit indemne lorsque le test donne un résultat négatif. Elle est définie par la formule suivante :

$$VPN = \frac{[Sp * (1 - pr)]}{[Sp * (1 - pr) + pr * (1 - Se)]} = \frac{VN}{VN + FN}$$

Pour un test donné, la VPP et la VPN sont des fonctions de la sensibilité, de la spécificité et de la probabilité pré-test. Ce dernier point est très important à considérer. En effet, en fonction de la qualité du clinicien à identifier les individus chez qui le test a de fortes chances d'être positif, le résultat aura d'autant plus de poids dans la démarche diagnostique.

### 2.3.3. Application à l'étude du pancréas exocrine

Dans le cadre de l'étude du pancréas exocrine, les biomarqueurs choisis doivent être spécifiques du pancréas (spécificité organique) et persister en quantité suffisante et suffisamment longtemps dans le sang avant leur élimination pour que le dosage soit possible et présente un réel intérêt diagnostique. Toutefois ceci est à nuancer car pour le cas d'affections aiguës, si le marqueur reste présent trop longtemps dans le sang, le résultat du test peut être contradictoire, c'est-à-dire en faveur d'un diagnostic alors que l'animal n'est plus atteint. Comme cela sera détaillé par la suite, ces marqueurs peuvent être des indicateurs de cytolysse tissulaire ou des marqueurs fonctionnels. La spécificité d'organe permet d'affirmer que l'organe mis en jeu est bien l'organe testé dès lors que le résultat est positif.

De plus, ils ne doivent être présents dans le sang qu'en situation pathologique ou sinon, présenter une valeur significativement différente chez un animal malade par rapport à un animal sain.

Enfin, il faut pouvoir valider le test chez la population considérée par la confrontation avec un test de référence (Gold Standard).

### **3. BIOMARQUEURS DE L'EXPLORATION DE LA CYTOLYSE DU PANCREAS CHEZ LE CHIEN**

Le pancréas est une glande à la fois exocrine et endocrine dont les fonctions biologiques sont complexes et assurées par deux types de tissus bien distincts [20, 82]. La grande majorité du tissu pancréatique constitue le pancréas exocrine, impliqué dans l'élaboration des sécrétions digestives déversées dans la lumière intestinale [20, 82]. Le pancréas endocrine constitue une petite partie du tissu organisé en petits îlots dispersés dans le parenchyme exocrine de la glande [20, 82]. Il sécrète des hormones dans le flux sanguin, qui régulent notamment la glycémie [20, 82].

Ici, seuls les marqueurs relatifs au pancréas exocrine sont présentés et discutés. Parmi ces marqueurs, certains permettent l'évaluation de la fonction pancréatique exocrine elle-même et d'autres orientent sur les lésions cellulaires occasionnées à la faveur d'une affection donnée [20, 90].

#### **3.1. Place des biomarqueurs de cytolysse pancréatique dans l'étude du pancréas exocrine**

Les affections du pancréas exocrine sont assez fréquentes chez le chien, et regroupent les pancréatites, l'insuffisance exocrine pancréatique (IEP), les « collections liquidiennes aiguës » (kystes et les abcès pancréatiques) [33] et les néoplasies [90].

Les pancréatites sont l'affection la plus courante, néanmoins, leur prévalence réelle demeure inconnue [66, 74, 89, 90]. De même que dans l'approche des lésions hépatiques, les tests ne permettent pas de diagnostiquer un type de lésions en particulier mais illustrent seulement une cytolysse pancréatique plus ou moins importante. C'est donc tout un spectre d'affections qui se cache derrière le terme pancréatite, allant de la simple augmentation de perméabilité membranaire à la nécrose cellulaire complète [91].

Il n'existe actuellement pas de consensus sur la définition, la classification et la terminologie exacte des pancréatites chez le chien, mais une dichotomie entre les formes aiguë et chronique est communément admise [91]. Contrairement à ce qui était précédemment publié, la forme chronique semble être plus souvent observée que la forme aiguë [74]. La première forme est accompagnée de changements permanents au sein du tissu pancréatique tels que la fibrose et l'atrophie, que l'on ne rencontre pas dans la seconde [74].

Il existe par ailleurs une pléthore de descriptions cliniques ou histopathologiques pour essayer de distinguer plus précisément les différentes formes et leur intensité (par exemple, modérée ou grave, œdémateuse, nécrosante, interstitielle, neutrophilique, lymphocytaire) [74].

Plusieurs analytes sont référencés depuis plusieurs dizaines d'années pour l'exploration du pancréas exocrine chez le chien et le chat [12, 89, 91]. Cependant, le diagnostic des pancréatites chez ces animaux demeure compliqué et parfois difficile car les signes cliniques sont en général peu spécifiques et il n'existe pas de test qui soit un véritable Gold Standard [12, 34, 72, 74, 89, 91].

L'autopsie avec examen histologique du pancréas peut être considérée comme un Gold Standard, même si sa mise en œuvre n'est pas toujours accessible et son interprétation souvent difficile et parfois non-diagnostique [12, 89]. L'examen histopathologique est aussi l'unique moyen de différencier les pancréatites aiguës et chroniques [91].

Compte tenu de l'orientation de l'étude clinique menée au cours de ce travail, seule les marqueurs de de cytolysse pancréatique chez le chien sont détaillés ici.

Bilan hématologique, analyse d'urine, imagerie médicale sont des examens qui ont été décrits et étudiés et peuvent également être mis en œuvres lors de la démarche diagnostique. Cependant il est important de rappeler qu'ils n'ont pas tous le même impact diagnostique. Ces examens complémentaires non spécifiques du pancréas ne sont pas détaillés dans les paragraphes suivants.

## **3.2. Activités enzymatiques de la lipase conventionnelle (LC) et de l'amylase**

Le pancréas exocrine synthétise des enzymes digestives [82]. Il est donc normal que le dosage de l'activité de ces enzymes ait été envisagé pour le diagnostic des affections pancréatiques. Lors de phénomènes inflammatoires ou de lyse cellulaire importants tels que les pancréatites, les concentrations sériques ou plasmatiques en enzymes pancréatiques (amylase, lipase pancréatique, phospholipase A2 par exemple) sont augmentées. Ces enzymes sont libérées massivement par les cellules acinaires pancréatiques et drainées par le sang et la lymphe, ce qui explique leur présence en quantité anormalement élevée dans ce secteur.

Il est important de souligner la différence majeure entre les méthodes de quantification de l'activité d'une enzyme ou de dosage des concentrations en enzymes. Les méthodes de dosage classiques mesurent directement la quantité d'enzymes présentes dans le milieu. Les méthodes catalytiques conventionnelles mesurent l'activité d'une enzyme en quantifiant la dégradation spécifique de son substrat [68]. D'autre part, des méthodes immunologiques détectent un épitope (déterminant antigénique) sur l'enzyme grâce à des anticorps spécifiques et permettent ainsi la mesure de la concentration en protéines (l'enzyme dans ce cas-là). Plus récentes, ces dernières sont hautement spécifiques [68].

### **3.2.1. Activité enzymatique de la LC**

#### **3.2.1.1. Origine des lipases**

Le terme « lipase » couramment utilisé regroupe un ensemble d'enzymes qui entrent en jeu dans le métabolisme des lipides [89, 90]. Ces enzymes sont produites par des cellules variées de l'organisme comprenant les cellules acinaires pancréatiques, les cellules hépatiques et gastriques [89, 90]. Ces enzymes sont sécrétées directement sous forme active [82]. Le rôle de ces enzymes est l'hydrolyse des triglycérides [50, 70, 89].

Chez des chiens ayant subi une pancréatectomie, une diminution du niveau d'activité de ces enzymes suggère l'origine pancréatique évoquée précédemment [55]. Cependant,

l'activité sérique de la LC est très variablement réduite lors de pancréatectomie et demeure à un niveau élevé ce qui confirme l'origine multiple de cette enzyme et un rôle mineur du pancréas dans le maintien de la concentration en enzymes circulantes dans l'organisme [55, 66].

### **3.2.1.2. Facteurs de variation de l'activité de la LC**

Chez le chien, il existe un rythme circadien de production avec une amplitude de 120 UI/L entre les valeurs extrêmes mesurées [46].

Lors de phénomènes inflammatoires touchant le pancréas, on constate une augmentation de l'activité sérique de la LC [4, 76, 77, 81]. Cependant, la valeur de l'activité de la LC n'est pas toujours au-dessus de la limite supérieure de l'IR fourni par le fabricant du test [46, 76]. Ceci peut être expliqué par la demi-vie relativement courte de ces enzymes [46, 76]. De même, d'autres conditions pouvant affecter la fonction rénale (insuffisance rénale, glomérulonéphrite, glomérulosclérose), la fonction hépatique (surchARGE lipidique, nécrose hépatocellulaire, lymphosarcome), la fonction intestinale (entérites, lymphosarcome, amyloïdose), la fonction cardiaque (hémangiosarcome) ou touchant plusieurs organes à la fois (lymphosarcomes, lésions d'amyloïdose) peuvent être à l'origine d'une augmentation de l'activité de la LC [12, 34, 47, 49, 66, 77].

Le problème majeur rencontré ici est qu'un test catalytique comme celui utilisé pour la quantification de l'activité de la LC ne permet pas de différencier l'organe atteint parmi ceux mis en jeu dans la production de lipases [66, 70]. De plus, une étude a comparé la mesure de l'activité de la LC chez des chiens sains et des chiens atteints d'IEP et il a été montré que l'activité de la LC n'était pas significativement différente entre ces deux groupes d'animaux [62, 71]. Les valeurs mesurées de l'activité de la LC étaient plus importantes chez les chiens souffrant d'IEP (sauf 1) que chez les chiens sains [62, 71]. Le résultat inverse était attendu puisque l'IEP affecte directement la fonction pancréatique.

Par ailleurs, la prednisone ou la dexaméthasone peuvent induire une augmentation de l'activité de la LC [13, 45].

### 3.2.1.3. Performances diagnostiques de l'activité de la LC pour les pancréatites

Le dosage de l'activité sérique de la LC est utilisé depuis des décennies pour le diagnostic des pancréatites chez l'homme et les carnivores domestiques [40, 66, 69, 77]. Cependant, il est maintenant reconnu chez le chien que ce dosage manque de sensibilité et de spécificité [12, 66, 69, 70, 77].

Selon les auteurs, les valeurs de sensibilité et de spécificité sont très variables. Le tableau présenté en **annexe 1** présente une synthèse des différentes études disponibles sur les marqueurs de cytolysse pancréatique ayant défini des valeurs de sensibilité et de spécificité pour ces tests.

En ce qui concerne les pancréatites chroniques, une sensibilité de 31.8 à 44% est rapportée pour la LC [72, 84]. Aucune donnée n'est disponible concernant la spécificité. Dans le cas de pancréatites aiguës, la sensibilité est en général moyenne avec des valeurs entre 39 et 60% [17, 21, 39, 80]. Une étude mentionne tout de même 90.2% sans préciser le type de pancréatite étudié [26]. L'importante variation observée pour ces valeurs vient du fait que ces études n'ont pas toutes le même protocole, n'utilisent pas toutes le même test de référence et ne retiennent pas toutes la même valeur seuil de positivité du test. En effet, Kook et al propose la meilleure valeur de sensibilité mais utilisent l'examen échographique comme méthode de référence par exemple ; les autres auteurs utilisent en général l'examen nécropsique.

De plus, dans environ 50% des cas de pancréatites confirmées par un examen nécropsique, les animaux présentent une activité de la LC considérée comme physiologique ; une étude sur 70 chiens a d'ailleurs montré que 48.3% des animaux avaient une activité de la LC et de l'amylase comprise dans les IR du fabriquant [21]. De ce fait, l'activité de la LC n'est pas optimale pour exclure l'hypothèse diagnostique de pancréatite. A l'inverse, il est possible d'avoir une activité de la LC largement augmentée sans aucune lésion pancréatique comme le montre une étude rétrospective, où 48.3% des animaux testés illustraient cette affirmation [34]. Il n'y a donc aucune garantie pour qu'un animal souffrant de pancréatite présente une activité de la LC augmentée [34].



Plusieurs auteurs notent qu'une augmentation de la valeur de l'activité de la LC d'au moins trois à cinq fois la limite supérieure de l'IR du test peut être évocatrice de pancréatite chez l'animal considéré et présentant un tableau clinique compatible avec une pancréatite [34, 70, 77, 89]. Une étude prospective sur 14 chiens a d'ailleurs montré que pour ces animaux, chez qui les lésions de pancréatite chronique ont été confirmées par un examen histologique, la sensibilité de l'activité de la LC était de 28% (en prenant en compte un seuil de positivité de trois fois la limite supérieure de l'IR du test) [84]. En considérant les valeurs strictement au-dessus de l'IR, cette même étude rapporte une sensibilité de 44% [84]. Une autre étude rapporte que 7 chiens sur 11 avec des pancréatites spontanées confirmées à l'histologie ont eu des valeurs de l'activité de la LC mesurée supérieure à trois fois la limite supérieure de l'IR soit une sensibilité de 54.5% [76].

Des travaux récents ont mis en évidence une nouvelle méthode de dosage qui semble plus pertinente pour cet analyte. Celle-ci utilise le 1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid-(6'-methylresorufin)-ester (DGGR) comme substrat de la réaction et non le 1,2-diglycéride (1,2 DiG), classiquement mis en œuvre dans les autres méthodes de dosage [17]. L'évaluation et la validation analytique de cette méthode ont montré un bon niveau de concordance avec le test quantitatif de la lipase spécifique pancréatique [17, 26]. Confronté à un diagnostic clinique et échographique, ce test apparaît plus sensible pour l'identification des chiens souffrant de pancréatites que les dosages mettant en œuvre le 1,2 DiG [17]. Avec une sensibilité de 76.5 à 93.3%, ce test serait intéressant en première intention pour écarter l'hypothèse de pancréatite en cas de résultat négatif [17, 26]. En revanche la spécificité moyenne de 40.7 à 53.3% limite son utilisation [17, 26]. Des études comparant le DGGR avec un « Gold Standard » sont maintenant nécessaires afin de préciser le seuil à considérer pour le diagnostic des pancréatites, *a priori* différent de celui proposé pour les méthodes utilisant le 1,2 DiG.

En dépit de relativement mauvaises valeurs de sensibilité et de spécificité pour le diagnostic de pancréatites aiguës ou chroniques [12, 66, 69, 90], la mesure de l'activité de la LC demeure le test le plus utilisé actuellement du fait d'un coût très faible, d'une bonne disponibilité et de sa rapidité d'exécution [18]. Cependant il est préférable de confronter les

résultats avec ceux de tests plus spécifiques pour établir un diagnostic définitif de pancréatite [12, 66, 69, 77].

Dans un contexte de très forte suspicion, sur la base d'éléments cliniques, d'une valeur de l'activité de la LC très augmentée chez un animal non azotémique, cet analyte conserve un intérêt diagnostique non négligeable. Il demeure donc un test utilisable en première approche même s'il n'est pas suffisant dans beaucoup de cas [12, 89].

### 3.2.2. Activité enzymatique de l'amylase

#### **3.2.2.1. Origine de l'amylase**

L'amylase pancréatique est une enzyme digestive synthétisée par les cellules acinaires pancréatiques impliquée dans le métabolisme des glucides [50]. Sécrétée dans la lumière intestinale directement sous forme active, elle intervient dans la réaction de dégradation de l'amidon présent dans l'alimentation en sucres simples [82]. De même que pour la LC, les tests qui sont détaillés ici ne mesurent pas la quantité d'enzyme mais la concentration en activité catalytique de l'enzyme.

Comme pour la LC, chez des chiens ayant subi une pancréatectomie, une diminution du niveau d'activité de cette enzyme confirme une origine au moins potentiellement pancréatique [55]. Néanmoins, l'activité sérique de l'amylase demeure à un niveau relativement important lors de pancréatectomie ce qui suppose l'existence de sources extra-pancréatiques pour le maintien de cette activité enzymatique [55, 66].

#### **3.2.2.2. Facteurs de variation de l'activité de l'amylase**

Chez le chien, il existe une variation circadienne de l'activité de l'amylase avec une amplitude de 220 UI/L entre les valeurs extrêmes mesurées [46].

Des affections variées touchant les fonctions pancréatique, rénale, hépatique, intestinale ou des néoplasies conduisent à une augmentation de la valeur de l'activité de l'amylase [4, 12, 34, 47, 66, 77, 81]. Des travaux ont en effet montré que des chiens

présentant des signes de pancréatite confirmée (spontanée ou expérimentalement induite) avaient une valeur de l'activité de l'amylase augmentée [40, 77]. Cependant ce résultat est à nuancer car il existe également des chiens atteints de pancréatites spontanées chez qui la valeur de l'activité de l'amylase reste dans l'IR [77]. Il est important de préciser que dans le cadre de lésions cellulaires affectant le pancréas, on n'observe pas d'augmentation de l'activité de l'amylase sans augmentation de l'activité de la LC [12, 40, 77]. C'est pourquoi, une augmentation de l'activité de l'amylase sans augmentation de la LC est nettement moins en faveur d'une pancréatite que l'augmentation concomitante de ces deux paramètres [40].

Contrairement à ce que l'on observe dans le cas de la LC, la prednisone ou la dexaméthasone administrées à des chiens sains induisent une diminution de l'activité de l'amylase [13, 32, 45].

### **3.2.2.3. Performances diagnostiques de l'activité de l'amylase pour les pancréatites**

Plusieurs équipes ont travaillé sur la mesure de la sensibilité et de la spécificité de cet analyte pour le diagnostic des pancréatites chez le chien. L'**annexe 1** reprend les résultats de ces différentes études.

En ce qui concerne les pancréatites chroniques, une sensibilité de 40.9 à 67% est rapportée [72, 84]. Aucune donnée n'est disponible concernant la spécificité. Dans le cas de pancréatites aiguës, la sensibilité se situe entre 7 et 78 % [17, 21, 39, 80]. Pour les mêmes raisons que celle évoquées pour l'activité de la LC il existe une très grande variation des valeurs de sensibilité et de spécificité de l'activité de l'amylase pour le diagnostic des pancréatites chez le chien.

Il est important de se rappeler que des chiens avec des lésions de pancréatite confirmées peuvent présenter une valeur de l'activité de l'amylase dans l'IR [21]. En effet, dans une étude, il est rapporté que 30.8% des chiens atteints de pancréatites aiguës confirmées par histologie avaient une valeur de l'activité de l'amylase dans l'IR [21].

Ces données amènent à conclure, de même que pour l'activité de la LC, que la mesure de l'activité de l'amylase n'est pas le meilleur outil pour le diagnostic des pancréatites chez le chien. Du fait de son élimination rénale, d'un manque de sensibilité et de spécificité, il peut être utilisé en première intention mais doit être confirmé par d'autres tests.

### **3.3. Concentration en Immunoréactivité de la lipase pancréatique canine (cPLI)**

Il a été montré précédemment que l'activité de la LC mesurée avec un test catalytique est le reflet de l'activité d'un certain nombre d'isoformes de la lipase, synthétisées et sécrétées par des tissus distincts. Même si leur fonction est commune (hydrolyse des triglycérides), toutes ces enzymes n'ont pas la même structure moléculaire car elles sont codées par des gènes différents [90]. Ceci explique en partie le manque de spécificité du test catalytique observé pour le diagnostic des pancréatites [68]. En effet, ce test mesure non seulement l'activité catalytique de la cPL mais également celles des autres lipases [68, 90]. De plus, un test catalytique ne mesure que l'activité des enzymes actives, ce qui diminue sa sensibilité. Au contraire, théoriquement, un test radio-immunologique permet de cibler et de doser spécifiquement une de ces enzymes [68, 89, 90]. Comme le souligne un abstract, la mesure de TLI reste la référence pour évaluer la fonction pancréatique, néanmoins, la mesure de la concentration en cPLI est un bon marqueur de souffrance cellulaire [62].

#### *3.3.1. Développement et validation des tests cPLI*

##### **3.3.1.1. Isolement de la lipase spécifique du pancréas**

La cPL est exclusivement synthétisée par les cellules acinaires pancréatiques et présente une structure différente des autres lipases de l'organisme [90]. Elle a d'abord été isolée à partir de sécrétions pancréatiques et récemment à partir de tissu pancréatique [65].

Cette enzyme est spécifique d'espèce et d'organe [64]. En effet, parmi 38 tissus testés chez le chien, seul le pancréas réagit positivement à la détection immunologique de la cPL [64]. De plus, la cPLI a été mesurée chez des chiens souffrant d'IEP et il a été montré que son expression est extrêmement diminuée comparée à celle observée chez des chiens sains [62, 71]. Les valeurs mesurées étaient en dessous de la limite inférieure de l'IR, ce qui corrobore bien le fait que cette enzyme est exclusivement synthétisée et sécrétée par le pancréas [62, 71].

Après cet isolement et sachant que lors d'inflammation ou de lésions des cellules acinaires, la cPL rejoint la circulation sanguine, plusieurs tests ont été élaborés et validés chez le chien et le chat pour mesurer la cPLI dans le sérum [12, 89, 90].

### **3.3.1.2. Développement et validation des tests originaux**

En premier lieu, un Radio-Immuno-Essai (RIA) et un test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ont été développés [12, 68, 89]. La technique ELISA permet de s'affranchir de la contrainte majeure de la mise en œuvre des RIA, c'est-à-dire manipuler des matériels radioactifs. Les intervalles de référence de cPLI, déterminés chez un groupe de 74 chiens cliniquement sains, sont respectivement de 4.4 - 276.1 µg/L avec le RIA et de 2.2 - 102.1 µg/L avec le test ELISA [67, 68]. Ces tests ont été validés analytiquement et ont prouvé leur sensibilité, précision et reproductibilité, indispensables pour une utilisation clinique [68].

### **3.3.1.3. Développement de validation du Spec cPL**

Compte tenu d'une disponibilité trop limitée des tests originaux, le test « Specific Canine Pancreatic Lipase » (Spec cPL) a été développé et validé analytiquement [12, 22, 89]. Ce second test présente certaines différences avec le test ELISA original. Il utilise tout d'abord un peptide recombinant comme antigène, alors que le test original utilisait la cPL purifiée [22, 67, 68]. De plus, des anticorps monoclonaux produits chez des souris sont mis en jeu alors que des anticorps polyclonaux produits chez des lapins étaient utilisés auparavant [22, 67, 68]. Enfin, le protocole ELISA mis en œuvre diffère légèrement [22, 67, 68, 89]. Avec ce test, la limite haute de l'intervalle de référence, mesurée à partir de 93

chiens, est de 216 µg/L [22]. Plus simplement, les valeurs inférieures à 200 µg/L avec ce test sont considérées comme physiologiques [22]. Les concentrations mesurées supérieures à 400 µg/L sont considérées compatibles avec un diagnostic de pancréatite et l'intervalle 200 - 400 µg/L représente des valeurs dites augmentées qui constituent une zone douteuse (zone grise) où un second test est nécessaire dans un délai de 2-3 semaines [39, 89]. Lors de l'étude analytique de ce test, une bonne corrélation avec le test ELISA original et de bons niveaux de précision et de reproductibilité ont été mis en évidence [22] ainsi qu'une bonne concordance avec les méthodes de dosage de la LC [26]. Il n'existe par ailleurs pas d'interférence avec les lipides, l'hémoglobine ou la bilirubine que l'on pourrait rencontrer dans le sérum testé [22].

#### **3.3.1.4. Développement et validation du test rapide SNAP cPL**

La mise en œuvre du Spec cPL dans une démarche diagnostique nécessite en général au moins une journée en plus du délai nécessaire à l'acheminement du prélèvement pour obtenir le résultat [89]. Afin de fournir une réponse plus précoce et d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients, un test semi-quantitatif, visuel et facile à interpréter, réalisable au chevet du patient, a été développé : le SNAP cPL, commercialisé actuellement par le laboratoire IDEXX [2, 89]. Ce dernier test, met en œuvre des anticorps monoclonaux de même que le test quantitatif Spec cPL [2, 12, 89]. L'intensité de la couleur du point « référence » est calibrée à une concentration approximativement de 200 µg/L alors que celle du point « échantillon testé » sera proportionnelle à la concentration en cPL du sérum en question [2].

Deux résultats sont alors possibles en fonction de la couleur relative du point de référence et du point de l'échantillon de sérum testé : normal ou anormal [2, 89]. Dans le cas d'un résultat normal, la couleur du point « échantillon » apparaît d'intensité inférieure à celle du point « référence » [2]. Cela signifie que la concentration en lipase pancréatique est inférieure à 200 µg/L [2].

Dans le cas d'un résultat anormal, la couleur du point « échantillon » apparaît d'intensité égale ou supérieure à celle du point « référence » et cela signifie que la concentration en cPL est dans la zone douteuse (intervalle 200 - 400 µg/L) ou compatible

avec un diagnostic de pancréatite (valeur supérieure à 400 µg/L) [2]. Dans ce cas, une confirmation avec le test quantitatif (Spec cPL) est recommandée [89].

Lors de l'étude analytique une excellente corrélation avec le test quantitatif et une grande reproductibilité et exactitude ont été mise en évidence pour ce test rapide [2]. En effet, ces travaux ont montré que pour un échantillon avec une concentration normale en cPLI (inférieure à 200 µg/L), le SNAP cPL possède 96% à 100% de concordance avec le Spec cPL. En revanche, pour une concentration élevée en cPLI (supérieure à 200 µg/L), il n'y a que 88% à 92% de concordance [2]. Ceci signifie que dans un contexte de suspicion moyenne et de valeurs de cPLI faiblement augmentées, il y a plus de chance que le résultat anormal soit erroné [2]. C'est pourquoi une confirmation par le test quantitatif Spec cPL est recommandée [2, 12]. Dans un contexte où la suspicion est très forte et où le SNAP cPL revient normal, il y a entre 8 et 12% de chance que ce résultat soit un faux négatif ; la confirmation par le test quantitatif est alors indispensable. Dans l'étude de McCord *et al*, 4 chiens ont présenté un résultat de SNAP anormal associé à des valeurs de Spec cPL inférieures à 200 µg/L et 5 chiens avaient un résultat de SNAP normal mais des valeurs de Spec cPL supérieures à 200 µg/L [39]. Tous ces chiens avaient été classés comme non-suspects de pancréatite aiguë par un groupe d'experts [39].

Bien entendu, un tel test pose le problème de l'appréciation de l'intensité de la couleur du point, qui peut être variable d'un utilisateur à l'autre, notamment lorsque les couleurs sont très proches.

### 3.3.2. Facteurs de variation de cPLI

Afin de fournir une aide notable pour les vétérinaires, un outil diagnostique ne doit pas être affecté par certains paramètres, tel que le temps d'attente avant la réalisation de la mesure. Concernant la cPL, il a été démontré que les concentrations sériques demeurent stables 21 jours à une température de stockage allant de -80°C à 4°C [75]. De plus, les dosages réalisés sur sérum ou sur plasma donnent des résultats similaires [75].

La mesure de cPLI possède une forte variabilité interindividuelle caractérisée par un coefficient de variation est de 49.5% [6]. Il est donc intéressant d'essayer d'identifier des sous-populations de chiens avec des valeurs sensiblement différentes de cPLI et de définir des IR spécifiques. La variabilité intraindividuelle est beaucoup plus importante avec un facteur variation de 193.8% [6]. De plus, il a été montré qu'il faut avoir une différence d'au moins un facteur 4.5 de cPLI chez un individu apparemment sain pour considérer que la différence observée est bien le reflet d'un changement pathologique chez l'animal et non d'une variation biologique intraindividuelle normale [6]. Les petites variations ont ainsi plus de chances d'être attribuées à la variation intraindividuelle ou analytique [6]. Cela se traduit alors par la possibilité pour des animaux sains d'avoir ponctuellement une valeur de cPLI à la limite de l'IR sans pour autant présenter de lésions pancréatiques [6].

Contrairement à l'activité de la LC ou de l'amylase, la cPLI n'est pas affectée par un traitement à base de prednisone [13, 45, 75]. Une publication mentionne que chez des chiens épileptiques traités avec du bromure de potassium, du phénobarbital ou une combinaison des deux, il y a un risque plus important d'observer une augmentation de la valeur de cPLI mais aucune différence significative n'est observée entre les groupes traités et le groupe contrôle pour la valeur seuil de 199.9 µg/L [73].

Il semblerait que la L-asparaginase, utilisée seule n'induit pas d'augmentation de cPLI ; en revanche, administrée conjointement avec de la vincristine, une augmentation de l'immunoréactivité peut être constatée mais celle-ci n'est pas significative [87]. Une seule étude rapporte ces faits ; d'autres études sont nécessaires pour étayer ou infirmer ces postulats.

Chez les chiens atteints de syndrome dilatation-torsion de l'estomac, une augmentation de cPLI peut être observée [23].

Selon une étude chez des chiens naturellement infectés par *Ehrlichia canis*, 20% des animaux présentent une augmentation de cPLI compatible avec une pancréatite modérée mais sans répercussion clinique [41].

Pour 16 chiens chez qui une insuffisance rénale chronique a été induite expérimentalement, une augmentation significative de cPLI a été observée par rapport aux animaux sains [63]. Toutefois cette augmentation reste minime (valeurs restant dans l'IR) et



ce résultat ne concerne que des cas d'insuffisance rénale expérimentale [63]. D'autres études sur des cas d'insuffisance rénale spontanée seraient donc nécessaires afin de préciser ce point.

Chez des animaux sains, une cytoponction à l'aiguille fine ou une biopsie de pancréas n'affectent pas la valeur de cPLI [10]. Cependant, l'effet d'un tel prélèvement chez un chien dont le pancréas est affecté est inconnu. Comme ce sont des interventions qui peuvent conduire à des lésions tissulaires il semble plus intéressant de réaliser ces prélèvements après la prise de sang [89].

Bien que la teneur en graisse d'un repas n'affecte pas la valeur de cPLI ; après un repas, on observe une très légère augmentation qui ne présente pas de valeur significative [25]. C'est pourquoi il est préférable de réaliser le prélèvement sur un animal mis à jeun 12h au préalable même si cela n'est pas idéal dans la prise en charge de certaines affections [25].

### 3.3.3. Performances diagnostiques du dosage de cPLI dans le cadre des pancréatites chez le chien

Après la mise en place d'un nouvel outil diagnostique, il est important de s'intéresser à ses performances diagnostiques. La sensibilité et la spécificité de cPLI pour le diagnostic des pancréatites chez le chien ont été étudiées. Bien que de nombreuses techniques puissent être mise en œuvre dans le diagnostic des pancréatites, il n'existe pas de Gold Standard même si l'examen nécropsique est considéré comme tel. En effet, comme les lésions de pancréatites sont souvent focales, il faudrait analyser de très nombreuses zones afin de rejeter avec certitude le diagnostic de pancréatite par cet examen [43].

L'**annexe 1** présente les valeurs de sensibilité et de spécificité obtenues dans les différentes études qui se sont intéressées à ce marqueur. La sensibilité du Spec cPL pour le diagnostic des pancréatites aiguës varie de 43 à 90% et la spécificité de 72 à 100% [19, 37, 39, 80]. Lors de pancréatites chroniques, la sensibilité du cPLI varie de 26 à 67% [72, 84]. Là encore des différences remarquables entre les valeurs existent dues au choix de la méthode de référence et de la valeur seuil pour le diagnostic des pancréatites.

En combinant les quatre études (total de 98 cas) qui évaluent la sensibilité de cPLI (Spec cPL) avec l'histologie comme méthode de référence, une valeur de sensibilité plus globale peut être obtenue [33, 37, 72, 76, 80]. Celle-ci est de 43.8%, avec comme valeur seuil 400 µg/L [33]. Toutefois, cette valeur est associée à un contexte d'inflammation très modérée qui ne correspond pas exactement à la population susceptible d'être rencontrée en pratique générale.

La mesure de la concentration de cPL est aujourd'hui le marqueur le plus sensible et le plus spécifique pour le diagnostic des pancréatites chez le chien. Cependant, il ne faut pas oublier que les chiffres présentés précédemment proviennent d'études différentes, avec des méthodologies, des populations et des protocoles souvent différents. De plus, d'autres études sont nécessaires à l'évaluation de la spécificité de cPLI, notamment sur des groupes où la pancréatite est une hypothèse diagnostique à considérer.

D'un point de vue pratique, le SNAP cPL est d'un grand intérêt dans la prise en charge d'un chien souffrant de signes digestifs aigus tels que vomissements ou douleur abdominale. Dans le cas d'un résultat normal, les autres hypothèses diagnostiques doivent être investiguées ; un résultat anormal sera confirmé par le test quantitatif en laboratoire (Spec cPL). Un résultat pour le Spec cPL inférieur à 200 µg/L et/ou un SNAP cPL négatif sont en faveur d'une absence de pancréatite aiguë [39]. En revanche, un test Spec ou SNAP cPL positif doit être confronté à la clinique et à l'imagerie médicale pour soutenir l'hypothèse qu'une pancréatite aiguë explique la présentation clinique.

McCord et al ont montré qu'un résultat positif pour le Spec cPL ou le SNAP possède une grande VPP dans un contexte de forte suspicion de pancréatite aiguë ; inversement, un résultat négatif possède une grande VPN dans un contexte de faible prévalence de pancréatite [39].

Une étude très récente remet quelque peu en cause certaines qualités précédemment développées concernant le Spec cPL et le SNAP cPL [19]. Cette étude s'est intéressée à la concordance entre les résultats de ces tests et un diagnostic final de pancréatite aiguë [19]. Trente-huit chiens avec un diagnostic final de pancréatite aiguë établi par un consensus sur les éléments cliniques et les conclusions d'échographie abdominale ont

été inclus [19]. Bien qu'une concordance correcte entre les deux tests ait été montrée, quelques résultats ne concordent pas avec le diagnostic clinique final [19]. En effet, parmi les animaux atteints de pancréatite aiguë 2/11 avaient un SNAP cPL négatif et 3/10 un Spec cPL inférieur à 400 µg/L [19]. Les faux positifs représentaient 41% (11/27) et 23% (6/26) des chiens respectivement pour le SNAP cPL et et Spec cPL [19]. Par ailleurs, les sensibilités et spécificités du SNAP cPL et du Spec cPL ont été calculées [19]. Elles sont respectivement de 82% et 59% pour le SNAP cPL et de 70% et 77% pour le Spec cPL. Les valeurs de spécificité sont moindres que celles précédemment publiées [37, 39, 42, 80]. Les valeurs de sensibilités sont quant à elles similaires [37, 39, 72, 80].

En ce qui concerne la gravité de l'affection, l'utilisation de la concentration de cPLI n'est pas très fiable [72, 80]. D'une façon générale, l'évaluation de la gravité clinique des pancréatites chez le chien demeure difficile même sur la base d'examen histopathologiques [35]. Une corrélation significative, même si le coefficient demeure faible ( $\rho$  Spearman = 0.47 ; P-value = 0.0060) existe entre le niveau d'inflammation pancréatique et la concentration en cPLI [37]. En revanche aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre ce marqueur et le niveau de fibrose pancréatique [37]. Des études cliniques sont encore nécessaires afin de trouver une corrélation possible entre un système de scoring et d'autres marqueurs de la gravité des pancréatites [89].

Enfin, il pourrait être intéressant d'utiliser la concentration en cPLI pour suivre l'évolution d'une pancréatite. Une étude, rapportée sous la forme d'un abstract, s'est intéressée à mesurer la concentration en cPL au cours de la prise en charge thérapeutique des 71 chiens inclus (qui présentaient au départ une concentration en cPL augmentée) [48]. Bien qu'une diminution progressive des valeurs ait été observée, celles-ci demeurent augmentées dans 30% des cas, même après la résolution des symptômes [48]. Toutefois ceci est peut être dû à la sensibilité plus forte de ce paramètre, capable de détecter une inflammation plus modérée au sein de l'organe, même après résolution des symptômes. Connaissant la grande variabilité intraindividuelle de ce test, il est recommandé de considérer des variations importantes par rapport à la valeur basale (facteur 2 ou 3) pour considérer un changement pertinent de l'état de l'affection chez un individu [89].

### **3.4. Immunoréactivité de la trypsine et du trypsinogène (TLI)**

#### *3.4.1. Un test d'exploration fonctionnelle du pancréas*

Le trypsinogène est la forme inactive (zymogène) de la trypsine, enzyme protéolytique, synthétisée par les cellules acinaires pancréatiques et sécrétée dans le duodénum où elle est activée par une entérokinase [90]. La concentration sérique en TLI est utilisée initialement pour l'exploration fonctionnelle du pancréas [12, 74]. C'est le marqueur de choix pour le diagnostic de l'IEP [12, 74, 85]. Un test a été développé et validé chez le chien et a montré d'excellents résultats [86]. Une sensibilité de 100% chez des chiens atteints d'IEP et une spécificité de 100% chez des chiens avec des affections de l'intestin grêle sont rapportées [86]. C'est un test spécifique d'organe et d'espèce qui mesure dans le sang à la fois le trypsinogène et la trypsine (libre ou liée aux inhibiteurs) [55, 66, 86].

#### *3.4.2. Facteurs de variations de TLI*

Il a été montré que des chiens souffrant de pancréatites expérimentalement induites présentent une augmentation rapide et transitoire du niveau de TLI sanguin [54, 66]. De même, le niveau de TLI est significativement augmenté lors de pancréatites chroniques [34, 72, 76]. Néanmoins, cela semble n'être le cas que chez 40% des individus atteints de pancréatites spontanées et l'on rencontre également des animaux atteints de pancréatites avec des valeurs de TLI dans l'IR du fabricant [66, 80, 86]. Il est donc important de se souvenir qu'un résultat considéré comme physiologique n'est pas suffisant pour rejeter l'hypothèse d'une inflammation ou d'une cytolysse pancréatique.

Une cytoponction à l'aiguille fine ou une biopsie du pancréas peuvent induire une augmentation de la valeur de TLI et/ou des lésions tissulaires [10].

Une étude a montré que TLI peut être augmenté chez des animaux présentant une insuffisance rénale (2 chiens parmi le groupe contrôle de 27 chiens) [34]. Dans un contexte d'azotémie, ce marqueur est donc plus délicat à interpréter [34].

Enfin, un traitement à base de dexaméthasone peut aussi induire une augmentation artéfactuelle et temporaire de ce paramètre [32].

### 3.4.3. Performances diagnostiques de TLI pour le diagnostic des pancréatites

Plusieurs études se sont intéressées à la mesure de la sensibilité et la spécificité de ce marqueur pour les pancréatites. Comme le montre le tableau en **annexe 1**, selon les auteurs, la sensibilité du test varie entre 17% et 36.4% [34, 72, 80, 84]. La spécificité quant à elle, a été évaluée à 65.4% [38].

Cependant, bien que le TLI soit assez spécifique, ce n'est pas un marqueur suffisamment sensible et il semble qu'il n'y ait pas de réel intérêt à l'utiliser plutôt que les activités sériques de l'amylase ou de la LC pour le diagnostic des pancréatites [12, 38]. Ce manque de sensibilité peut s'expliquer par l'élimination très rapide du trypsinogène du flux sanguin [12, 66]. Ce marqueur peut donc être utile si le dosage de cPLI n'est pas disponible, pour autant qu'une insuffisance rénale ait été écartée au préalable [91]. De plus, un résultat normal, ne permet pas d'éliminer de façon certaine l'hypothèse de cytolyse pancréatique du diagnostic différentiel [90].

Enfin, le degré d'augmentation de TLI ne donne aucune information sur la gravité de l'atteinte tissulaire en cours [34].

## **3.5. Biomarqueurs utilisés de façon plus marginale pour l'exploration du pancréas exocrine**

### 3.5.1. Elastase-1 pancréatique

L'élastase-1 a été initialement étudiée pour le diagnostic de l'IEP par recherche dans les selles [12]. Il s'agit de la mesure de la concentration d'une enzyme protéolytique spécifique du pancréas, résistante à l'hydrolyse et stable lors de son passage dans l'intestin [12]. Un test ELISA pour la doser spécifiquement dans les selles a été développé et est actuellement commercialisé en Europe pour le diagnostic de l'IEP [60]. Ce test possède une sensibilité de 100% et une spécificité de 56.5% pour le diagnostic de l'IEP chez le chien [59].

Lors de phénomènes inflammatoires, l'élastase-1 est responsable de l'auto entretien des mécanismes mis en jeu et peut passer dans le secteur sanguin [36]. Une étude récente s'est intéressée à l'utilisation de ce marqueur, dosé dans le sang, comme indicateur de pancréatite et a déterminé les valeurs de sensibilité et spécificité pour cette affection [36]. Une différence significative a été montrée entre le groupe de 49 chiens atteints de pancréatites (tous types) et le groupe de 12 chiens avec des affections ne touchant pas le pancréas (affection digestives, rénales, néoplasiques ou à médiation immune) [36]. De même, une différence significative entre les pancréatites aiguës graves et les affections ne touchant pas le pancréas a été observée [36]. En prenant comme seuil de positivité du test la valeur 17.24 ng/mL, la sensibilité et la spécificité du test sont respectivement de 61.36% et 91.67% pour le diagnostic de tous les types de pancréatites (**annexe 1**) [36]. Ce test est plus sensible pour le diagnostic de la forme aiguë grave (sensibilité de 78.26%) devant les autres formes, comme cela est le cas en médecine humaine [36].

Compte tenu de la combinaison d'une spécificité importante, d'une VPP élevée et d'une VPN basse, une augmentation de ce marqueur semble bien être le reflet d'une pancréatite [36]. Enfin, les chiens atteints de pancréatite chronique présentaient des valeurs basses d'élastase-1, ce qui est en faveur d'une diminution de la fonction exocrine pancréatique [36].

Une autre étude a mesuré les valeurs de l'élastase-1, de l'amylase, de LC et de TLI chez 7 chiens ayant subi une pancréatographie par endoscopie rétrograde, procédure qui engendre de l'inflammation localement [61]. Aucune différence n'a été observée entre les valeurs basales et les valeurs mesurées après l'examen pour l'élastase-1 alors que des différences ont été observées pour les autres marqueurs [61].

En résumé, ce marqueur est très intéressant pour le diagnostic des formes graves de pancréatites aiguës mais les formes modérées ou chroniques nécessitent encore une confirmation histologique. Cependant, les formes graves de pancréatites aiguës sont en général plus faciles à identifier cliniquement que les formes plus modérées ou évoluant à bas bruit.

### 3.5.2. Peptide d'activation du trypsinoqène (TAP)

Produit par clivage lors de l'activation du trypsinogène en trypsine, ce petit peptide est normalement présent dans la lumière duodénale [12, 34, 38, 66]. Normalement, il ne se rencontre pas dans le sang [12, 34, 38, 66]. Une étude rapporte cependant qu'il est possible de détecter de faibles quantités de TAP chez des chiens sains [34].

Il arrive que l'activation du trypsinogène en trypsine se produise dans le tissu pancréatique, par exemple lors de pancréatites ; le TAP peut alors passer dans le secteur sanguin en quantité importante [12, 66]. Il est ensuite éliminé par les reins [12]. Il semble que les concentrations sanguines de ce marqueur soient beaucoup plus augmentées dans les formes graves de pancréatites que dans les formes plus modérées [34].

Ce marqueur ne présente malheureusement pas une sensibilité ni une spécificité suffisante pour être un indicateur de choix dans le diagnostic des pancréatites [34, 38]. En effet, dans une étude sur des chiens avec des pancréatites aiguës ou chroniques identifiées à l'examen nécropsique, la sensibilité du TAP plasmatique était moyenne avec une valeur de 53.3%. La spécificité quant à elle avait une valeur plus élevée à 75.9% mais qui reste insuffisante par rapport aux autres test plus facilement accessibles [38]. Néanmoins, le TAP peut être un bon indicateur de pronostic dans le cas de pancréatites spontanées [34].

Ce dosage n'est plus commercialisé [12, 66].

### 3.5.3. Complexes inhibiteurs de la Trypsine

Normalement, l'activation du trypsinogène ne peut avoir lieu que dans la lumière intestinale. Néanmoins, il arrive que les mécanismes d'activation soient initiés de façon prématurée au sein des cellules du parenchyme pancréatique [12, 34, 74]. Il est alors possible que la trypsine passe dans la circulation sanguine générale du fait de l'inflammation du tissu pancréatique [12, 74]. Le plasma contient cependant des inhibiteurs de protéase notamment l'inhibiteur- $\alpha$ 1 de la Trypsine et l' $\alpha$ 2-Macroglobuline qui se lient aux protéines afin d'inhiber leurs actions et les lésions qui pourraient alors survenir [69, 74].

### **3.5.3.1. L'inhibiteur- $\alpha$ 1 de la trypsine**

L'inhibiteur- $\alpha$ 1 de la trypsine est un inhibiteur de la trypsine qui se lie de façon réversible à cette dernière lorsque celle-ci passe dans la circulation générale à la faveur d'une inflammation du tissu pancréatique par exemple [12, 66, 69, 79]. De même que chez l'homme et les rongeurs, cet inhibiteur est présent dans le sang en quantité importante lors de pancréatites expérimentalement induites chez le chien [78, 79]. Un test diagnostique immuno-enzymatique (ELISA) mesurant la quantité de complexe trypsine-inhibiteur a été développé et validé chez le chien [78, 79]. Des travaux basés sur l'étude d'un groupe de 22 chiens, présentant à l'autopsie, des signes macroscopiques évidents de pancréatite (hémorragie pancréatique, pus à la section de l'organe et capsule granuleuse et terne), ont montrés que la mesure de cette molécule possède une sensibilité de 31.8% [72]. Dans une autre étude rapportée sous la forme d'un abstract, ce marqueur apparait comme un indicateur de la gravité des pancréatites [78]. En revanche, compte tenu de sa présence très précoce et transitoire dans le sang aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les chiens souffrant de pancréatites spontanées alors que les auteurs en ont montré une chez les chiens souffrant de pancréatites expérimentalement induites [78].

C'est pourquoi ce marqueur n'est pas considéré comme un bon indicateur de pancréatites chez le chien.

### **3.5.3.2. L' $\alpha$ 2-Macroglobuline**

L' $\alpha$ 2-Macroglobuline est le deuxième inhibiteur plasmatique de la trypsine qui intervient dans la protection contre les effets néfastes de cette enzyme lors d'activation prématurée au sein du tissu pancréatique [66, 69]. Contrairement à l'inhibiteur- $\alpha$ 1 de la Trypsine, celle-ci se fixe de façon irréversible à la Trypsine [66, 69]. Cette fixation induit un changement de conformation de l'enzyme et le complexe formé peut ensuite être rapidement éliminé de l'espace vasculaire par le système réticuloendothélial [66, 69]. Un test diagnostique a été développé et validé chez le chien [52]. Lors d'épisodes de pancréatite une diminution significative de la quantité de cet inhibiteur peut être constatée [51]. En revanche, ce marqueur ne permet pas de documenter la gravité de l'affection et il n'a pas



été montré de réel intérêt diagnostique dans l'étude et la détection des pancréatites chez le chien [51].

#### 3.5.4. Marqueurs non-sanguins de l'exploration du pancréas exocrine

##### **3.5.4.1. Ratio TAP:créatinine urinaire**

Le TAP, présenté précédemment, peut aussi être mesuré dans les urines et caractérisé par l'intermédiaire du ratio TAP:créatinine dans l'urine afin d'évaluer l'excrétion de TAP sur 24 heures mais ces tests sont peu disponibles [34, 66]. L'étude présentée dans le paragraphe traitant du TAP rapporte que la mesure de ce ratio n'est pas très sensible (50%) mais possède une spécificité d'environ 95% [34].

##### **3.5.4.2. Mesure de la LC dans fluide péritonéal**

Compte tenu de la physiopathologie et du diagnostic différentiel des pancréatites, l'utilisation du fluide péritonéal présent lors d'ascite peut être un outil complémentaire dans l'établissement du diagnostic. Une étude s'est en effet intéressée à la mesure de l'activité de la LC dans le fluide péritonéal de 44 chiens présentant des affections variées causant de l'ascite [18]. Cette étude a montré que les chiens atteints de pancréatite aiguë (diagnostiquée par histopathologie, n = 4 ou par échographie, n = 3) avaient une valeur de l'activité de la LC dans le fluide péritonéal significativement supérieure aux autres groupes de chiens (traumatisme abdominal, masse abdominale, hépatopathie, ou atteinte cardiaque) avec des valeurs environ deux fois supérieures à celles observées dans le sang [18]. Les mesures sanguines quant à elles, n'ont pas montré de différences significatives entre les différents groupes [18].

### **3.6. Conclusion**

Sur le plan de la biologie clinique, il n'existe pas de test parfait permettant l'exploration lésionnelle du pancréas chez le chien bien que le Spec cPL apparaisse comme le test le plus intéressant. C'est donc la prise en compte globale de l'historique, de la présentation clinique et des résultats d'examens complémentaires (biologie clinique, imagerie médicale, histopathologie) qui va permettre d'établir un diagnostic. Il est important de rappeler qu'une augmentation des analytes sanguins de l'exploration du pancréas exocrine peut avoir lieu concomitamment à une affection d'autres organes notamment les reins, le foie, l'estomac.

## **Partie 2: Etude clinique**



## 1. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Le Dogue de Bordeaux (DDB) est un chien de type molossoïde brachycéphale appartenant au groupe 2 de la classification de la Fédération Cynologique Internationale. Aujourd'hui, la prédisposition raciale du Dogue de Bordeaux pour une glomérulonéphropathie juvénile héréditaire et son impact sur certaines valeurs de paramètres biochimiques sont connus et décrits [27].

Partant de ce constat, deux récentes études se sont intéressées à la race DDB et ont publié les intervalles de références des analytes biochimiques sanguins [28] et les paramètres hématologiques [29] à partir d'échantillons de 62 et 58 chiens respectivement. Dans la première étude, l'IR pour l'activité de l'amylase ne présente pas de différences avec celui proposé par le fabricant de l'automate de mesure ; en revanche une différence significative a été observée pour l'activité de la LC [28].

En effet, 75% des chiens présentaient une activité de la LC au-dessus de la limite supérieure de l'IR fourni par le fabricant (10 – 2 000 UI/L), avec des valeurs allant jusqu' à 15 368 UI/L [28]. Parmi les hypothèses pouvant expliquer une telle augmentation de cette activité, une glomérulopathie ou des lésions de cytolysse pancréatique sont à considérer [47, 77]. Dans cette étude, les limites de l'IR de la créatinine étaient proches de celles fournies par le fabricant, ce qui rend l'hypothèse d'une insuffisance rénale peu probable [28]. Par ailleurs, les chiens sélectionnés étaient cliniquement sains et ne présentaient donc pas de signe évident de pancréatite [28].

Chez le Schnauzer Miniature, une hyperlipidémie est souvent constatée et maintenant largement reconnue comme responsable de la prévalence importante de pancréatites diagnostiquées chez cette race [69, 90]. En effet, les chiens présentant un sérum hyperlipidémique ont 3.9 fois plus de chance d'avoir une pancréatite [30]. Une hypertriglycéridémie est également souvent observée sans savoir à l'heure actuelle si celle-ci est une cause ou une conséquence de la pancréatite [74]. Dans l'étude de Lavoué et al, environ 10% des chiens présentaient une hypercholestérolémie mais sans hypertriglycéridémie concomitante [28].

Dans le cas du DDB, il apparait alors que l'hyperlipasémie constatée peut être constitutive de la race. L'objectif de l'étude présentée ici est de préciser l'origine pancréatique possible de cette particularité par la mesure de cPLI et de TLI et de rechercher une corrélation entre ces analytes d'une part, et la détermination des limites de leurs intervalles de référence pour la race DDB d'autre part.

## **2. MATERIELS ET METHODE**

### **2.1. Protocole expérimental**

Lors de l'étude sur les intervalles de référence des analytes biochimiques sanguins du DDB une déviation vers le haut des limites de l'IR de la LC a été constatée [28]. Une étude rétrospective sur les mêmes chiens, tous cliniquement asymptomatiques a alors été mise en place afin de préciser les raisons de cette particularité.

Les prélèvements de sérum étaient conservés à -80°C au congélateur du laboratoire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Ils ont été classés et envoyés aux Etats-Unis afin d'y réaliser les dosages de cPLI et de TLI en partenariat avec l'Université du Texas (Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biochemical Sciences, Texas A&M University, USA). Les IR de ces 2 analytes ont ensuite été établis selon les recommandations du CLSI [9] et de l'ASVCP [14]

### **2.2. Constitution de l'échantillon de référence**

#### **2.2.1. Recrutement des animaux**

Les chiens recrutés pour cette étude sont de race DDB, provenant d'élevages affiliés aux clubs de race Français ou Belge. Au total, 96 chiens ont pu être considérés pour l'inclusion.

Le jour du prélèvement, les éleveurs ont signé un consentement éclairé et ont complété un questionnaire épidémiologique reprenant l'état de santé de l'animal, son passé médical et son statut reproducteur.

Les animaux ont été déclarés sains sur la base d'un examen clinique complet sans anomalie, effectué par un vétérinaire préalablement au prélèvement et de l'absence de problème ou anomalie rapportée par l'éleveur le jour-même du prélèvement. Afin de minimiser tout effet pré-analytique, l'emploi du temps habituel des chiens a été préservé au mieux le jour de prélèvement, au domicile du propriétaire.

Les chiens sont identifiés par leur rang d'inclusion « de A1 à AX ». Pour préserver l'anonymat, l'impartialité des analyses et de leur interprétation, le rang d'inclusion est le seul élément d'identification connu pour chaque animal.

### 2.2.2. Critères d'inclusion

Pour être inclus dans l'étude, les chiens doivent satisfaire les critères suivants :

- Etre de race DDB avec un pédigrée disponible (enregistrement au Livre des Origines) ;
- Etre âgés de 1 à 10 ans ;
- Etre jugés en bonne santé (par l'intermédiaire des réponses des éleveurs au questionnaire et par la réalisation d'un examen clinique complet par un vétérinaire) ;
- Etre à jeun depuis au moins 12 heures avant la réalisation des prélèvements ;

### 2.2.3. Critères d'exclusion

Afin de prévenir l'introduction d'animaux non-sains dans l'échantillon de référence, les critères d'exclusion suivant ont été définis :

- Ne rentre pas dans la fenêtre d'âge ;
- Non à jeun ;
- Gestation ou lactation en cours pour les femelles ;
- Affection récente ou chronique déjà diagnostiquées par un vétérinaire ou diagnostiquée durant les 30 jours suivant l'inclusion ;
- Sous traitement médical autre qu'antiparasitaires interne et externe ;
- Anomalie détectée à l'examen clinique ;
- Volume du spécimen de moins de 1000 µL ;

L'ensemble des chiens répondants à ces critères a été prélevé dans chacun des élevages afin de maximiser le nombre de spécimens.



Le degré d'hémolyse et la décongélation/re-congélation des spécimens n'ont pas été retenus comme critères d'exclusion.

### **2.3. Réalisation des prélèvements sanguins**

L'ensemble des prélèvements a été réalisé entre les mois de janvier et décembre 2011. Pour minimiser le stress des animaux, faciliter le prélèvement et minimiser les facteurs pré-analytiques de variation, l'examen clinique complet et le prélèvement sanguin ont eu lieu au domicile du propriétaire de l'animal (respect des activités habituelles de l'animal, pas de tonte). La prise de sang a été effectuée sur une veine jugulaire par un vétérinaire en appliquant une contention et une compression minimales. Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une aiguille 21 gauges (0.8 x 25 mm, Neolus, Terumo Europe N.V., Leuven Belgium) connectée à système Vacutainer (VenojectLuer adapter, Terumo Europe, N.V., Leuren Belgium). Deux tubes collecteurs secs (Clot Activated 4mL, Venosafe, Terumo, Guyencourt, France) ont été prélevés. Le prélèvement est ensuite identifié pour chaque chien « AX ». La réalisation des prélèvements est en accord avec les normes CLSI [8].

Les tubes ont été homogénéisés par 10 retournements lents et conservés à température ambiante en attendant les analyses suivantes, faites dans les 30 minutes suivant le prélèvement. Les tubes ont été mis à décanter dans un porte tube le temps nécessaire à la formation d'un caillot en accord avec les normes du Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) [7]. Le sérum surnageant a alors été réparti dans 4 tubes Eppendorf de 1.5mL (tube 1.5mL, Safe Lock, Eppendorf, Le Pecq, France) et identifiés « S AX ». Les spécimens ainsi obtenus ont été congelés entre -22°C et -18°C avant et pendant leur acheminement jusqu'au laboratoire de l'ENVT par un transporteur médical spécialisé. Les spécimens ont ensuite été stockés à -80°C au laboratoire de l'ENVT avant de procéder à leur classement et à l'envoi sous glace carbonique au Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biochemical Sciences, Texas A&M University, USA pour la mesure de CPLI et de TLI.

Les conditions d'acheminement et de conservations des spécimens sont conformes aux normes CLSI [7].

## 2.4. Analyses biochimiques

Plusieurs analytes sanguins ont été dosés pour chacun des chiens inclus dans l'étude. Tout d'abord, l'activité de la LC a été mesurée sur plasma hépariné lors de la précédente étude réalisée par Lavoué et al. Cette étude a permis de déterminer son intervalle de référence chez le DDB. Ensuite, les dosages de cPLI et de TLI ont été réalisés sur sérum au Gastrointestinal Laboratory, Texas.

### 2.4.1. Dosage de l'activité de la LC

Après décongélation à température ambiante (environ 30 minutes), l'activité de la LC a été mesurée par une méthode de chimie sèche au moyen d'un analyseur spécifique (Chemistry system Vitros 350, Ortho-Clinical diagnostics, Issy les Moulineaux, France) et des réactifs associés (Vitros MicroSlides tests, Ortho-Clinical diagnostics, Issy les Moulineaux, France). Les coefficients de variations intraindividuelle et interindividuelle sont pour ce test inférieur à 10%. L'intervalle de référence spécifique de la race DDB est 773 - 5704 U/L [28].

### 2.4.2. Mesure quantitative de la concentration en cPLI

Après réception et décongélation des spécimens par le Gastrointestinal Laboratory, Texas, le dosage de cPLI a été réalisé. Le test Spec cPL, développé et validé par ce laboratoire et les laboratoires IDEXX a été mis en œuvre [22]. Les échantillons doivent être des fractions de sérum non-hémolysé d'un volume minimum de 0.5 ml. Ce test utilise des plaques de 96 puits recouverts d'anticorps monoclonaux spécifiques de la cPL dans lesquels un mélange 1:3 de l'échantillon et d'une solution d'anticorps anti-cPL conjugués avec une peroxydase est ajouté. Après incubation et lavage des puits, une mesure de la densité optique est effectuée. La comparaison à une gamme de concentrations calibrées permet de mesurer la concentration en cPL. L'IR pour ce dosage, fourni par le laboratoire est 0 - 200 µg/L [89]. L'intervalle 201 - 399 µg/L constitue une zone grise et les valeurs supérieures à 400 µg/L sont considérées comme diagnostique de pancréatites [89]. Les coefficients de variations intraindividuelle et interindividuelle pour ce test sont inférieurs à 12%.

### 2.4.3. Mesure de TLI

Après réception et décongélation des spécimens par le Gastrointestinal Laboratory, Texas, le dosage de TLI a été réalisé. Les échantillons doivent être des fractions de sérum non-hémolysé d'un volume minimum de 0.5 ml. Le test mis en œuvre est le test commercial proposé par le Gastrointestinal Laboratory, Texas (Double Antibody Canine TLI, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.). C'est un RIA double anticorps quantitatif. La trypsine, le trypsinogène contenu dans le sérum à tester et la trypsine inactivée marquée à l'iode radioactif sont en compétition pour la fixation aux anticorps. Ensuite, une gamma-caméra mesure la quantité d'anticorps liés à l'antigène radioactif et fournit une valeur chiffrée de la concentration en TLI grâce à une échelle de calibration.

L'IR pour ce test, fourni par le laboratoire est 5.7 – 45.2 µg/L. Les coefficients de variations intraindividuelle et interindividuelle pour ce test sont inférieurs à 5%.

L'ensemble des résultats a été fourni par le Gastrointestinal Laboratory, Texas, sous forme d'une feuille de calcul Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) (**Annexe 2**).

## 2.5. Traitement statistique des données

Après la réception des résultats et exclusion *a posteriori* des animaux ne satisfaisant pas les critères d'inclusion et d'exclusion, l'influence de l'âge a été étudiée. Un modèle linéaire généralisé a été mis en œuvre grâce au logiciel Systat (Systat 13, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) et a permis de tester l'effet de l'âge sur les valeurs des analytes.

Les corrélations entre les variables LC et cPLI, LC et TLI, cPLI et TLI ont été caractérisées par le coefficient de corrélation de Spearman et testées. Ces calculs ont été effectués avec le logiciel R version 2.10.0.

Pour chaque analyte, une courbe de distribution a été réalisée. L'inspection visuelle a permis de détecter toute valeur aberrante puis une confirmation statistique a été faite par la méthode de Dixon. Les limites des IR et leurs intervalles de confiance à 90% ont été

déterminés par une méthode non paramétrique, conformément aux recommandations du CLSI [9] et de l'ASVCP [14].

Pour la détermination des limites des intervalles de référence, l'ensemble des calculs a été effectué avec le tableur Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), et le freeware Reference Value Advisor V 2.1 [1]. Dans le cas d'un effectif suffisant ( $n \geq 40$ ), ce calcul peut être effectué avec une méthode non paramétrique [15]. Les limites de référence sont données sous forme d'une valeur chiffrée associée à un intervalle de confiance à 90% calculé par une méthode Bootstrap afin de traduire l'incertitude statistique des valeurs obtenues [15].

### 3. RESULTATS

Avant de s'intéresser à proprement parler aux résultats des dosages et mesures, il est important de rappeler que les DDB qui ont été inclus ici sont les mêmes que ceux utilisés dans la précédente étude menée par Lavoué et al. [28]. Chez ces animaux, il a été montré que pour 75% des chiens utilisés pour la détermination des limites de référence, la valeur de la LC était augmentée avec des valeurs allant jusqu'à 15 368 UI/L. Un IR spécifique pour la race DDB a alors été établi avec les bornes suivantes : 773 – 5704 UI/L avec des intervalles de confiance à 90% respectivement de 750 – 996 et 5123 – 5738 [28].

#### 3.1. Caractéristiques de l'échantillon de référence

Quatre-vingt-seize chiens ont été initialement recrutés. Certains chiens ne satisfaisant pas les critères d'inclusion et d'exclusion ont été éliminés de l'échantillon : un chien de neuf mois (numéro 43) ; 2 chiens avec un diagnostic d'hypothyroïdie (numéros 35 et 36) ; 2 chiens avec un diagnostic de néphropathie protéinurique (numéro 58 et numéro 111). Tous avaient un examen clinique normal. Enfin, 1 chien chez qui un lymphome T a été diagnostiqué dans les 30 jours suivant l'inclusion (numéro 86). Soit 6 chiens exclus et un échantillon de référence de 90 chiens.

Les chiens recrutés étaient âgés de 13 à 118 mois, avec une médiane de 37 mois. Le **Tableau 3** donne la répartition des animaux selon leur sexe.

**Tableau 3 : Caractéristiques de l'échantillon de référence : sexe**

Sexe	Nombre	%
Femelle	63	70
Femelle stérilisée	1	1
Mâle	26	29
Mâle castré	0	0

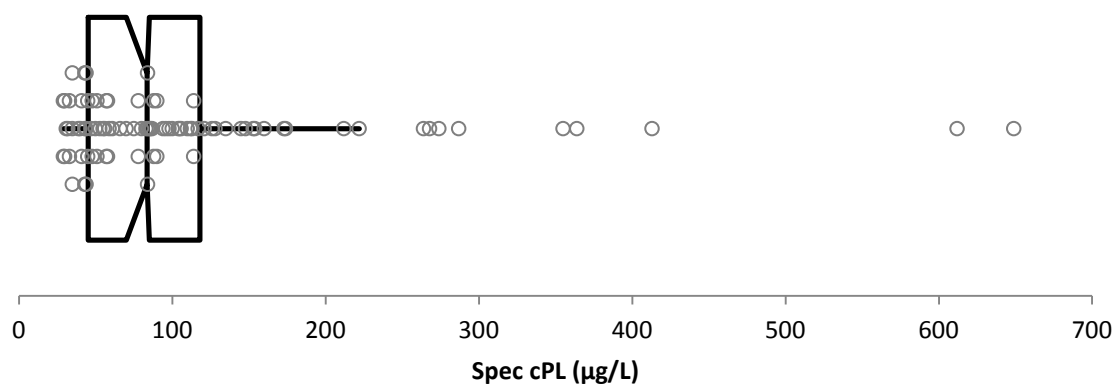
### 3.2. Description de la distribution des valeurs obtenues

Le **Tableau 4** présente une synthèse des valeurs minimum, médiane et maximum mesurées pour les analytes LC, cPLI et TLI.

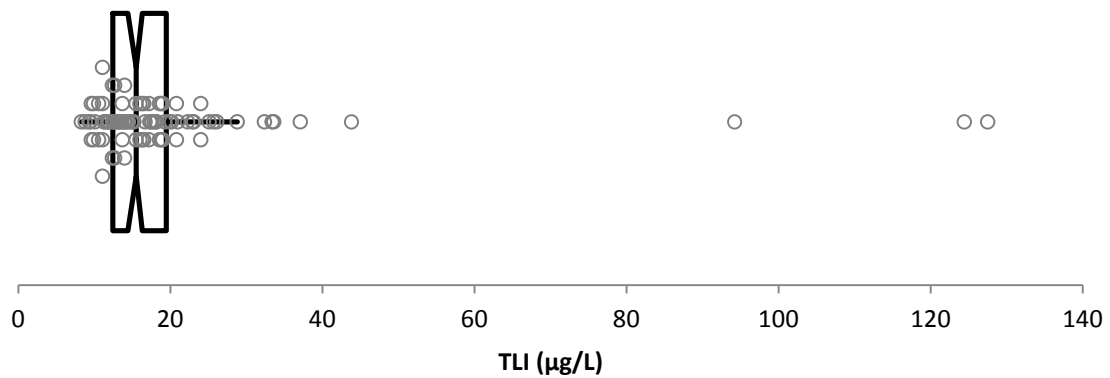
**Tableau 4 : Caractéristiques de la distribution des données brutes chez 90 DDB cliniquement sains (minimum, médiane et maximum)**

	Marqueurs		
	LC (UI/L)	cPLI ( $\mu\text{g/L}$ )	TLI ( $\mu\text{g/L}$ )
Minimum	722	29	8.3
Médiane	2730	83.5	15.5
Maximum	15368	649	127.5

Aucun des analytes spécifiques du pancréas ne se présente sous la forme d'une distribution Gaussienne. La **Figure 1** et la **Figure 2** ci-après sont des représentations graphiques des résultats obtenus pour le Spec cPL et le TLI.



**Figure 1: Distribution des valeurs de cPLI**



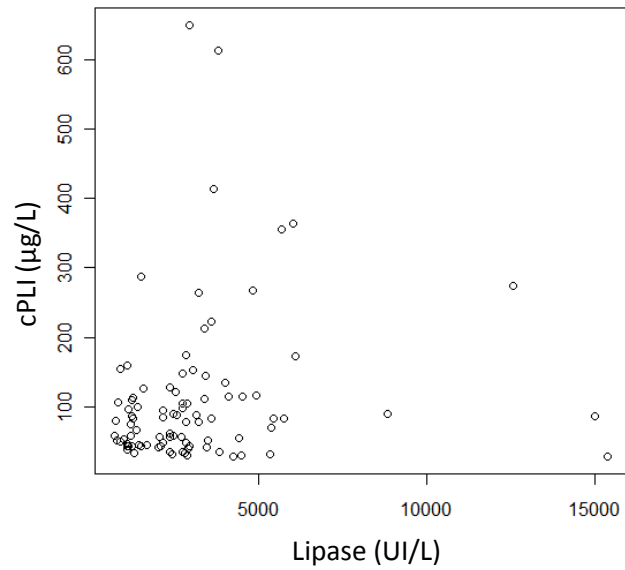
**Figure 2: Distribution des valeurs de TLI**

L'effet de l'âge, testé grâce à un modèle linéaire généralisé, n'est pas significatif pour ces deux analytes avec des valeurs de p-value de 0.602 et 0.928 pour le Spec cPL et le TLI respectivement.

### 3.3. Calculs de la corrélation entre les couples de variables

#### 3.3.1. Etude de la corrélation entre la LC et cPLI

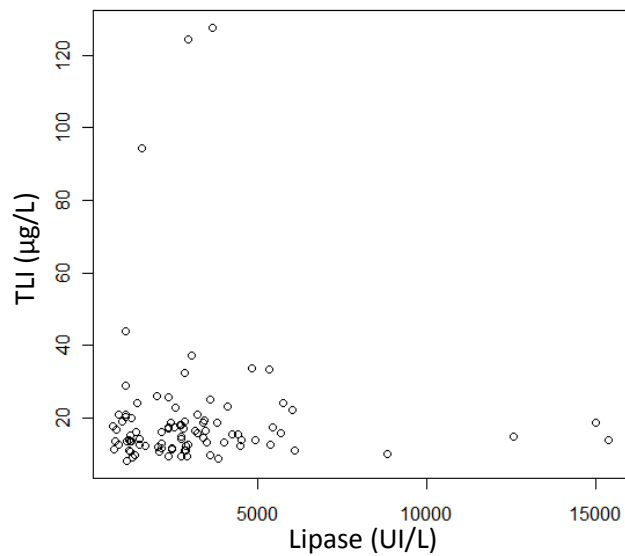
Un coefficient  $\rho = 0.208$  a été obtenu pour l'échantillon, ce qui atteste d'une très faible corrélation entre les deux variables comme cela s'apprécie visuellement sur la **Figure 3**. Cependant, ce résultat est à prendre en compte en considérant la p-value associée (p-value = 0.04908), qui dans le cas présent est inférieure à 0.05.



**Figure 3: Représentation graphique des valeurs de cPLI en fonction des valeurs de Lipase**

*3.3.2. Etude de la corrélation entre la LC et TLI*

Ici, un coefficient  $\rho = 0.063$  été obtenu, ce qui atteste d’une absence de corrélation entre les deux variables (**Figure 4**). La P-value associée ( $p\text{-value} = 0.5541$ ) n’est pas strictement inférieure à 0.05 et n’est donc pas significative.

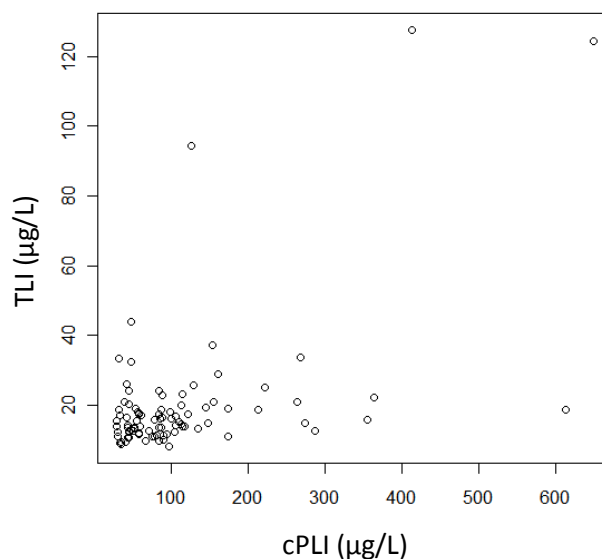


**Figure 4: Représentation graphique des valeurs de TLI en fonction des valeurs de Lipase**



### 3.3.3. Etude de la corrélation entre cPLI et TLI

La corrélation entre cPLI et TLI est faible avec un coefficient  $\rho = 0.35$  (**Figure 5**). La p-value associée est largement inférieure à 0.05 (p-value = 0.0007494).



**Figure 5: Représentation graphique des valeurs de TLI en fonction des valeurs de cPL**

## 3.4. Détermination des limites des intervalles de références

### 3.4.1. Détection et suppression des valeurs considérées comme aberrantes

Les histogrammes de distributions des valeurs de cPLI et TLI sont donnés en **annexe 3 Figure 6** et en **annexe 4 Figure 8**. La distribution sous la forme d'un histogramme, associée à la courbe de distribution Gaussienne, permettent une appréciation visuelle des valeurs aberrantes et de la normalité de la distribution.

L'analyse visuelle et la confirmation par la méthode de Dixon des valeurs extrêmes vont dans le sens des recommandations CLSI et de l'ASVCP car elles sont plus conservatrices. Celles-ci ont été appliquées aux distributions de cPLI et TLI.

Pour les valeurs de cPLI, les résultats de 2 chiens (numéros 52 et 71, avec respectivement des valeurs de cPLI de 612 µg/L et 649 µg/L) étaient très largement éloignés du reste de la cohorte. Ces deux valeurs ont donc été analysées comme un seul bloc et considérées comme aberrantes. Elles ont donc été éliminées de l'échantillon de référence.

En appliquant à nouveau la même méthode aux valeurs restantes, on ne trouve plus de valeurs aberrantes. L'effectif final est donc de 88 chiens pour la détermination des limites de référence, la distribution des valeurs est donnée en **annexe 3, Figure 7**.

En ce qui concerne le TLI, les deux valeurs extrêmes ont été éliminées (chiens numéros 71 et 88). La même méthode a été appliquée aux valeurs restantes et une valeur aberrante supplémentaire a été supprimée (chien numéro 92). Les limites de référence ont donc été déterminées à partir de 87 chiens. La distribution des valeurs est donnée en **annexe 4, Figure 9**.

#### 3.4.2. Détermination des limites de l'intervalle de référence spécifique de cPLI

Les limites inférieure et supérieure de l'IR spécifique de la race DDB sont 29.2 µg/L et 362.0 µg/L respectivement pour le cPLI (**Tableau 5**). Pour ces deux limites, les intervalles de confiance à 90% sont 29.0 – 31.2 et 272.7 – 413.0 respectivement pour la limite inférieure et supérieure.

#### 3.4.1. Détermination des limites de l'intervalle de référence spécifique de TLI

Les limites de référence de l'IR spécifique de la race DDB sont 8.9 µg/L et 36.4 µg/L respectivement pour TLI (**Tableau 5**). Pour ces deux limites, les intervalles de confiance à 90% sont 8.3 – 9.6 et 31.5 – 43.8 respectivement pour la limite inférieure et supérieure.

**Tableau 5 : Intervalles de référence des marqueurs cPLI et TLI chez le DDB**

	Limite inférieure de l'IR <i>Intervalle de confiance 90%</i> µg/L	Limite supérieure de l'IR <i>Intervalle de confiance 90%</i> µg/L	Intervalle de référence <b>fabriquant</b> µg/L
<b>cPLI</b>	<b>29.2</b> 29 – 31.2	<b>362</b> 272.7 - 413.0	< 200
<b>TLI</b>	<b>8.9</b> 8.3 – 9.6	<b>36.4</b> 31.5 – 43.8	5.7 – 45.2

## 4. DISCUSSION

Après avoir constaté une augmentation de l'activité de la LC chez une population de DDB recrutés pour la détermination d'intervalles de référence d'analytes biochimiques [28], les mêmes chiens ont fait l'objet d'une étude sur certains marqueurs pancréatiques plus spécifiques. Les corrélations entre la LC et cPLI ou TLI sont apparues significatives mais avec des coefficients rho de Spearman respectivement très faible et faible. Cette étude a déterminé les valeurs des limites de référence de cPLI et de TLI pour la race DDB, respectivement de 29.2 - 362 µg/L et 8.9 - 36.4 µg/L.

Quatre-vingt-dix chiens de la race DDB ont été inclus dans cette étude, ce qui constitue un échantillon de référence de taille importante et suffisante pour la détermination de limites de références. Par définition, une population de référence est constituée d'individus en « bonne santé ». Dans le cas présent, le même groupe de chiens que celui utilisé pour la définition des analytes biochimiques a été considéré afin de déterminer les limites des IR de cPLI et TLI. Ces chiens étaient tous cliniquement sains lors de leur inclusion dans l'étude. N'ayant pas de critères indiscutables pour définir la bonne santé d'un animal, il est nécessaire de définir des critères d'inclusion et d'exclusion très précis pour la sélection des individus de référence.

Ici, un entretien avec le propriétaire, un questionnaire et un examen clinique complet réalisé par un vétérinaire ont permis l'inclusion des animaux. Le choix a été de ne retenir que la clinique et de ne faire appel à aucun examen complémentaire pour définir la bonne santé des individus de référence. C'est un choix qui se veut similaire à la situation rencontrée en clinique où le vétérinaire ne dispose que d'un entretien avec le propriétaire et d'un examen clinique de l'animal. A titre de contre-exemple, l'étude de Nielsen et al publiée en 2009, sur les variations hématologiques et biochimiques de la race Bouvier Bernois a inclus des animaux en bonne santé sur la base de l'historique clinique, d'un examen clinique sans anomalie, d'une analyse d'urine, d'une échographie abdominale, de 3 vues radiographies thoraciques réalisés au moment de l'inclusion et 6 mois plus tard. Dans les 2 études de Lavoué et al, un rapport protéines sur créatinine urinaires supérieur à 0.3 avait été retenu comme critère d'exclusion et avait engendré l'exclusion d'un nombre important de chien (51

et 44 chiens) [28, 29]. Cependant, il semble évident que multiplier les examens complémentaires afin de justifier la bonne santé d'un animal n'est pas une démarche immédiate puisque ces derniers sont en général mis en œuvre lorsque le vétérinaire cherche à confirmer ou exclure une affection dans un contexte clinique défini.

Afin de répondre à la question initiale et savoir si l'augmentation constatée de LC était due à une augmentation de la cPL, Le calcul du coefficient de Spearman a été réalisé et il est possible d'affirmer que le coefficient de corrélation entre la LC et cPLI est significativement différent de zéro dans la population de DDB (p-value = 0.04908). Cependant, ce n'est pas tant la valeur de la p-value, tout juste inférieure à 0.05 ici, qui importe mais le coefficient rho, qui ici est assez faible ( $\rho = 0.21$ ), attestant d'une corrélation très faible entre ces marqueurs et donc d'une participation très limitée de la cPL à l'augmentation de la LC chez cette race. Il serait donc intéressant de poursuivre cette investigation et de rechercher une cause liée à la fonction digestive ou à la fonction rénale par exemple [34, 47].

Pour la détermination des valeurs des limites de références des IR de cPLI et TLI, six chiens ont fait l'objet d'une exclusion *a posteriori* car ils présentaient différentes affections ; les autres ont été considérés sains. L'étude des valeurs aberrantes a engendré l'exclusion de 2 chiens pour la détermination des limites de l'IR de cPLI et de 3 chiens pour celles de TLI. Un de ces chiens (numéro 71) présentait des valeurs de cPLI et TLI considérées comme aberrantes. Le chien numéro 88 a été exclu de l'effectif de TLI mais a été conservé dans celui de cPLI alors que sa concentration en cPLI était de  $413\mu\text{g/L}$ , valeur considérée comme diagnostique de pancréatite selon le fabricant du test [89].

Le cas de ces 2 animaux est intéressant à discuter. En effet, si un animal est sain et si les deux marqueurs sont corrélés (coefficient de corrélation inférieur à 0.35), alors la probabilité qu'un animal ait des valeurs au-dessus de la limite supérieure des intervalles de référence pour les deux marqueurs est inférieure à 0.00283368, soit 0.28%. Or, dans cette étude, 2 chiens sur 90 (2.22%) possèdent des valeurs de cPLI et TLI au-dessus de la limite supérieure de l'IR fournie par le fabricant, soit un effectif très supérieur à 0.28% du total. Cela infirme le fait que ces animaux sont sains ET que les marqueurs sont faiblement corrélés.

Il est alors nécessaire d'étudier la corrélation entre les deux variables pour voir si elle est  $\leq 0.35$  ou supérieure. Si celle-ci est inférieure à 0.35 il est possible de conclure que les marqueurs sont faiblement corrélés et par conséquent, que les 2 animaux en question sont malades. Il a été montré que le coefficient de corrélation de Spearman entre les variables cPLI et TLI avait pour valeur 0.3489. Les variables cPLI et TLI sont donc faiblement corrélées. De plus, ce calcul est associé à une P-value de 0.0007494, donc ce résultat est fortement significatif dans la population entière.

Il semble donc que ces deux animaux auraient dû être exclus des deux échantillons sur la base de suppositions cliniques (affection pancréatique potentiellement subclinique) afin de respecter la condition selon laquelle les limites des IR sont déterminées à partir d'animaux absolument sains. Cependant les critères les plus conservateurs recommandés pour la détection et l'élimination des valeurs aberrantes ne reconnaissaient pas la valeur de cPLI du chien numéro 88 comme telle. Il est toutefois intéressant de remarquer que ces deux individus présentaient des valeurs de l'activité de la LC dans l'IR de la race.

Parmi les 7 chiens avec une valeur de LC supérieure à l'intervalle de référence pour la race DDB, seulement 1 présentait une valeur de cPLI en dehors de l'IR défini pour cette race, à 364  $\mu\text{g/L}$  mais aucun ne présentait de valeur de TLI augmentée. Ceci est intéressant car l'augmentation assez importante de la LC constatée chez les DDB avait motivé l'exploration des paramètres de cytolysse pancréatique et il apparaît que les animaux avec les valeurs de LC les plus hautes ne sont pas ceux qui présentent les valeurs de cPLI au-dessus de la limite supérieure de l'IR.

En ce qui concerne l'effectif, les valeurs des limites d'un IR (et leurs intervalles de confiance à 90%) sont idéalement déterminées par une méthode non paramétrique à l'aide d'un minimum de 120 individus. Les résultats de cette étude ont été obtenus à partir de 88 et 87 individus respectivement pour cPLI et TLI, ce qui semble satisfaisant. Les limites de référence peuvent être calculées avec un effectif réduit à 40 individus, cependant, en réduisant l'effectif, on augmente l'imprécision avec laquelle on détermine les limites de l'IR. Ceci met ici en évidence une autre difficulté dans l'établissement d'IR spécifique de race. En effet, plus la population est restreinte plus il est difficile d'avoir accès à un nombre d'individus de référence important et concordant avec les recommandations actuelles.

Cette étude est la première à fournir un IR spécifique d'une race pour les marqueurs de cytolysse pancréatique. Une équipe s'est déjà intéressée aux prédispositions raciales pour les pancréatites chroniques, confirmées par un examen nécropsique [83], mais aucune étude ne rapporte d'IR spécifiques de race pour les paramètres pancréatiques courants. Concernant le TLI, l'IR pour la race DDB est plus étroit que l'IR fourni par le fabricant (5.7 – 45.2 µg/L). Il est donc préférable de continuer à travailler avec ce dernier afin d'être sûr de ne pas considérer certains animaux non-malade à tort. En revanche, pour cPLI, la limite supérieure de l'IR est comprise dans l'intervalle des valeurs de la zone grise fourni par le fabricant (200 – 400 µg/L) et l'imprécision sur la valeur de cette limite est importante. Onze pour cent des animaux possèdent une valeur pour cet analyte au-dessus de la limite fournie par le fabricant. Pour la cPLI il convient donc de considérer l'IR spécifique de la race DDB qui fournit une réponse plus précise pour une part importante des valeurs comprises dans la zone grise et limite ainsi le nombre de cas où une réévaluation est nécessaire.

Compte tenu du caractère rétrospectif de cette étude, les dosages de TLI et cPLI n'ont pas été réalisés en même temps que le reste des dosages de la première étude de Lavoué et al. Les spécimens ont été conservés plusieurs mois au congélateur à -80°C. Cependant, les concentrations en cPLI restent inchangées au moins jusqu'à 21 jours de stockage à une telle température [75]. Une étude évaluant l'impact d'un traitement à base de phénobarbital et/ou de bromure de potassium sur cPLI avait d'ailleurs été réalisée après une durée de stockage d'environ 3 mois [73]. Les auteurs mentionnent des données non publiées attestant d'une absence de différence significative sur les concentrations en cPLI au moins un an plus tard, après un stockage des spécimens au congélateur entre -80°C et -20°C [89]. En ce qui concerne TLI, la durée de stockage ne semble pas affecter les mesures.

Enfin, les propriétaires des chiens inclus dans cette étude sont régulièrement contactés afin de connaître l'état de santé de leurs animaux. Selon des données non publiées, aucun chien n'a à ce jour été présenté à un vétérinaire pour des troubles compatibles avec une affection pancréatique. Les valeurs augmentées et considérées comme aberrantes sont donc possiblement dues à la variation individuelle des valeurs obtenues pour les analytes plutôt qu'à une affection pancréatique subclinique au moment de l'inclusion dans l'étude.





## CONCLUSION

Cette étude a permis de définir deux nouveaux IR qui complètent ceux publiés par Lavoué et al pour les paramètres de biochimie générale et d'hématologie de la race DDB. Les valeurs des limites de référence (intervalle de confiance à 90%) de l'IR de cPLI sont 29.2 µg/L (29 – 31.2) et 362 µg/L (272.7 – 413.0). Celle de l'IR de TLI sont 8.9 (8.3 – 9.6) µg/L et 36.4 µg/L (31.5 – 43.8).

Une corrélation significative a été mise en évidence entre l'activité de la LC et cPLI, de même qu'entre cPLI et TLI. Compte tenu de la valeur des coefficients, ces corrélations restent faibles et il ne semble pas que l'augmentation de LC constatée chez le DDB soit directement la cause d'une augmentation de la cPL.

Ceci est la première étude à donner des IR spécifiques d'une race pour des paramètres pancréatiques, dont celui pour la cPL est intéressant à considérer à l'avenir par rapport à l'IR fourni par le fabricant. Il serait maintenant intéressant d'étendre ces études aux races dont on sait qu'elles présentent une prédisposition aux affections pancréatiques telles que les pancréatites chroniques notamment les Schnauzers miniatures, les Cavaliers King Charles Spaniels, les Boxers et les Labradors retrievers en étendant les critères d'inclusion pour ne retenir que des animaux sains ou en les suivant dans le temps.



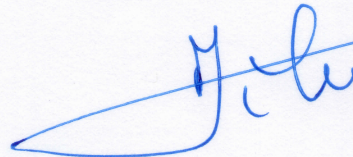
**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

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

Je soussigné, Olivier DOSSIN, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **ROCHER Clément** intitulée « **Particularités des intervalles de références de la lipase, de la lipase spécifique pancréatique canine (CPLI) et de l'immunoréactivité de la trypsine et du trypsinogène (TLI) chez le dogue de Bordeaux** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.



**Fait à Toulouse, le 26 mai 2014**  
**Docteur olivier DOSSIN**  
**Enseignant chercheur**  
**de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse**




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

**Vu :**  
**Le Président du jury :**  
**Professeur Jean-Pierre VINEL**



**Vu et autorisation de l'impression :**  
**Le Président de l'Université**  
**Paul Sabatier**  
**Professeur Bertrand MONTHUBERT**  
Par délégation, la Vice-Présidente du CEVU  
**Madame Régine ANDRÉ OBRECHT**



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



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. *Biostatistiques Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Reference Value Advisor macroinstructions.* <http://www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?article63>. consulté le 24/02/2014.
2. BEALL M.J., CAHILL R., PIGEON K., HANSCOM J. AND HUTH S.P., (2011), Performance validation and method comparison of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine pancreatic lipase. *J Vet Diagn Invest.* **23**(1): p. 115-9.
3. BOSTROM B.M., XENOULIS P.G., NEWMAN S.J., POOL R.R., FOSGATE G.T. AND STEINER J.M., (2013), Chronic pancreatitis in dogs: a retrospective study of clinical, clinicopathological, and histopathological findings in 61 cases. *Vet J.* **195**(1): p. 73-9.
4. BROBST D., FERGUSON A.B. AND CARTER J.M., (1970), Evaluation of serum amylase and lipase activity in experimentally induced pancreatitis in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* **157**(11): p. 1697-702.
5. CAMPORA C., FREEMAN K.P., SERRA M. AND SACCHINI F., (2011), Reference intervals for Greyhounds and Lurchers using the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer. *Vet Clin Pathol.* **40**(4): p. 467-74.
6. CARNEY P.C., RUAUX C.G., SUCHODOLSKI J.S. AND STEINER J.M., (2011), Biological variability of C-reactive protein and specific canine pancreatic lipase immunoreactivity in apparently healthy dogs. *J Vet Intern Med.* **25**(4): p. 825-30.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2004), *Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline, document H18-A3 Third Edition*, Wayne, Pennsylvania, USA.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2007), *Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by venupuncture; Approved Guideline, document H03-A6* Wayne, PA, USA.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute, (2008), *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, document C28-A3*, Wayne, PA, USA.
10. CORDNER A.P., ARMSTRONG P.J., NEWMAN S.J., NOVO R., SHARKEY L.C. AND JESSEN EMERITUS C., (2010), Effect of pancreatic tissue sampling on serum pancreatic enzyme levels in clinically healthy dogs. *J Vet Diagn Invest.* **22**(5): p. 702-7.
11. DELACOUR H., SERVONNET A., PERROT A., VIGEZI J.F. AND RAMIREZ J.M., (2005), ROC (receiver operating characteristics) curve: principles and application in biology. *Ann Biol Clin (Paris).* **63**(2): p. 145-54.
12. DOSSIN O., (2011), Laboratory tests for diagnosis of gastrointestinal and pancreatic diseases. *Top Companion Anim Med.* **26**(2): p. 86-97.
13. FITTSCHEN C. AND BELLAMY J.E., (1984), Prednisone treatment alters the serum amylase and lipase activities in normal dogs without causing pancreatitis. *Can J Comp Med.* **48**(2): p. 136-40.
14. FRIEDRICH K.R., HARR K.E., FREEMAN K.P., SZLADOVITS B., WALTON R.M., BARNHART K.F. AND BLANCO-CHAVEZ J., (2012), ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* **41**(4): p. 441-53.

15. GEFRE A., CONCORDET D., BRAUN J.P. AND TRUMEL C., (2011), Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol.* **40**(1): p. 107-12.
16. GOMMEREN K., DUCHATEAU L., PAEPE D., VANHOLEN L., VANDENBERGHE A. AND DAMINET S., (2006), Investigation of physiologic leukopenia in Belgian Tervuren dogs. *J Vet Intern Med.* **20**(6): p. 1340-3.
17. GRACA R., MESSICK J., MCCULLOUGH S., BARGER A. AND HOFFMANN W., (2005), Validation and diagnostic efficacy of a lipase assay using the substrate 1,2-o-dilauryl-rac-glycero glutaric acid-(6' methyl resorufin)-ester for the diagnosis of acute pancreatitis in dogs. *Vet Clin Pathol.* **34**(1): p. 39-43.
18. GUIJA DE ARES PACOCHAGA A., HITTMAIR K.M. AND SCHWENDENWEIN I., (2006), Comparison of lipase activity in peritoneal fluid of dogs with different pathologies--a complementary diagnostic tool in acute pancreatitis? *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* **53**(3): p. 119-22.
19. HAWORTH M.D., HOSGOOD G., SWINDELLS K.L. AND MANSFIELD C.S., (2014), Diagnostic accuracy of the SNAP and Spec canine pancreatic lipase tests for pancreatitis in dogs presenting with clinical signs of acute abdominal disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* **24**(2): p. 135-43.
20. HERDT T.H., (2007), Gastrointestinal Physiology and Metabolism : Secretion of the Gastrointestinal Tract : The Pancreas, in *Textbook of veterinary physiology*, J.G. Cunningham and B.G. Klein, Editors. Elsevier - Health Sciences Division. p. 331-333.
21. HESS R.S., SAUNDERS H.M., VAN WINKLE T.J., SHOFR F.S. AND WASHABAU R.J., (1998), Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic abnormalities in dogs with fatal acute pancreatitis: 70 cases (1986-1995). *J Am Vet Med Assoc.* **213**(5): p. 665-70.
22. HUTH S.P., RELFORD R., STEINER J.M., STRONG-TOWNSEND M.I. AND WILLIAMS D.A., (2010), Analytical validation of an ELISA for measurement of canine pancreas-specific lipase. *Vet Clin Pathol.* **39**(3): p. 346-53.
23. ISRAELI I., STEINER J., SEGEV G., KASS P.H., SUCHODOLSKI J.S., SATTASATHUCHANA P., BRUCHIM Y., YUDELEVITCH S. AND AROCH I., (2012), Serum pepsinogen-A, canine pancreatic lipase immunoreactivity, and C-reactive protein as prognostic markers in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J Vet Intern Med.* **26**(4): p. 920-8.
24. JACOBS R.M., SWENSON C.L., DAVENPORT D.J. AND MURTAUGH R.J., (1988), Sensitivity and specificity of canine serum total amylase and isoamylase activity determinations. *Can J Vet Res.* **52**(4): p. 473-5.
25. JAMES F.E., MANSFIELD C.S., STEINER J.M., WILLIAMS D.A. AND ROBERTSON I.D., (2009), Pancreatic response in healthy dogs fed diets of various fat compositions. *Am J Vet Res.* **70**(5): p. 614-8.
26. KOOK P.H., KOHLER N., HARTNACK S., RIOND B. AND REUSCH C.E., (2014), Agreement of Serum Spec cPL with the 1,2-o-Dilauryl-Rac-Glycero Glutaric Acid-(6'-methylresorufin) Ester (DGGR) Lipase Assay and with Pancreatic Ultrasonography in Dogs with Suspected Pancreatitis. *J Vet Intern Med.* **28**(3): p. 863-70.
27. LAVOUE R., VAN DER LUGT J.J., DAY M.J., GEORGES M., BUSONI V., MERVEILLE A.C., POUJADE A. AND PEETERS D., (2010), Progressive juvenile glomerulonephropathy in 16 related French Mastiff (Bordeaux) dogs. *J Vet Intern Med.* **24**(2): p. 314-22.
28. LAVOUE R., GEFRE A., BRAUN J.P., PEETERS D. AND TRUMEL C., (2013), Breed-specific biochemical reference intervals for the adult Dogue de Bordeaux. *Vet Clin Pathol.* **42**(3): p. 346-59.

29. LAVOUE R., GEFFRE A., BRAUN J.P., PEETERS D., GRANAT F., BOURGES-ABELLA N. AND TRUMEL C., (2014), Breed-specific hematologic reference intervals in healthy adult Dogues de Bordeaux. *Vet Clin Pathol*.
30. LEM K.Y., FOSGATE G.T., NORBY B. AND STEINER J.M., (2008), Associations between dietary factors and pancreatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. **233**(9): p. 1425-31.
31. LONGROIS D., AGAVRILOAIA M., DEVAUX Y. AND MERTES P.M., (2009), Comments on methodological problems related to the use of biomarkers in clinical practice and research. *Ann Fr Anesth Reanim*. **28**(5): p. 473-81.
32. LUCENA R., GINEL P.J., NOVALES M. AND MOLLEDA J.M., (1999), Effects of dexamethasone administration on serum trypsin-like immunoreactivity in healthy dogs. *Am J Vet Res*. **60**(11): p. 1357-9.
33. MANSFIELD C., (2012), Acute pancreatitis in dogs: advances in understanding, diagnostics, and treatment. *Top Companion Anim Med*. **27**(3): p. 123-32.
34. MANSFIELD C.S. AND JONES B.R., (2000), Plasma and urinary trypsinogen activation peptide in healthy dogs, dogs with pancreatitis and dogs with other systemic diseases. *Aust Vet J*. **78**(6): p. 416-22.
35. MANSFIELD C.S., JAMES F.E. AND ROBERTSON I.D., (2008), Development of a clinical severity index for dogs with acute pancreatitis. *J Am Vet Med Assoc*. **233**(6): p. 936-44.
36. MANSFIELD C.S., WATSON P.D. AND JONES B.R., (2011), Specificity and sensitivity of serum canine pancreatic elastase-1 concentration in the diagnosis of pancreatitis. *J Vet Diagn Invest*. **23**(4): p. 691-7.
37. MANSFIELD C.S., ANDERSON G.A. AND O'HARA A.J., (2012), Association between canine pancreatic-specific lipase and histologic exocrine pancreatic inflammation in dogs: assessing specificity. *J Vet Diagn Invest*. **24**(2): p. 312-8.
38. MANSFIELD C.S.J., B. R., (2000), Trypsinogen activation peptide in the diagnosis of canine pancreatitis [abstract]. *J Vet Intern Medicine*. **14**(3): p. 346.
39. MCCORD K., MORLEY P.S., ARMSTRONG J., SIMPSON K., RISHNIW M., FORMAN M.A., BILLER D., PARNELL N., ARNELL K., HILL S., AVGERIS S., GITTELMAN H., MOORE M., HITT M., OSWALD G., MARKS S., BURNEY D. AND TWEDT D., (2012), A multi-institutional study evaluating the diagnostic utility of the spec cPL and SNAP(R) cPL in clinical acute pancreatitis in 84 dogs. *J Vet Intern Medicine*. **26**(4): p. 888-96.
40. MIA A.S., KOGER H.D. AND TIERNEY M.M., (1978), Serum values of amylase and lipase in healthy mature dogs and dogs with experimental pancreatitis. *Am J Vet Res*. **39**: p. 965-9.
41. MYLONAKIS M.E., XENOULIS P.G., THEODOROU K., SIARKOU V.I., STEINER J.M., HARRIS S., LEONTIDES L., RALLIS T., SUCHODOLSKI J.S., KOUTINAS C.K. AND KOUTINAS A.F., (2014), Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity in experimentally induced and naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Vet Microbiol*. **169**(3-4): p. 198-202.
42. NEILSON-CARLEY S.C., ROBERTSON J.E., NEWMAN S.J., KUTCHMARICK D., RELFORD R., WOOSLEY K. AND STEINER J.M., (2011), Specificity of a canine pancreas-specific lipase assay for diagnosing pancreatitis in dogs without clinical or histologic evidence of the disease. *Am J Vet Res*. **72**(3): p. 302-7.
43. NEWMAN S., STEINER J., WOOSLEY K., BARTON L., RUAUX C.G. AND WILLIAMS D., (2004), Localization of Pancreatic Inflammation and Necrosis in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **18**(4): p. 488-493.
44. NIELSEN L., KJELGAARD-HANSEN M., JENSEN A.L. AND KRISTENSEN A.T., (2010), Breed-specific variation of hematologic and biochemical analytes in healthy adult Bernese Mountain dogs. *Vet Clin Pathol*. **39**(1): p. 20-8.

45. PARENT J., (1982), Effects of dexamethasone on pancreatic tissue and on serum amylase and lipase activities in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **180**(7): p. 743-6.
46. PICCIONE G., GIANNETTO C., FAZIO F. AND GIUDICE E., (2008), Daily rhythm of serum lipase and alpha-amylase activity in fed and fasted dogs. *J Vet Diagn Invest.* **20**(6): p. 795-9.
47. POLZIN D.J., OSBORNE C.A., STEVENS J.B. AND HAYDEN D.W., (1983), Serum amylase and lipase activities in dogs with chronic primary renal failure. *Am J Vet Res.* **44**(3): p. 404-10.
48. PRIOR L.M., FORMAN M.A., SHIROMA J., ROBERTSON J.E., HOSTULER R.A. AND BROWN C.D., (2009), Serial evaluation of canine pancreatic lipase (Spec cPL) in dogs with clinical signs of pancreatitis [abstract]. *J Vet Intern Medicine.* **23**(3): p. 733.
49. RALLIS T.S., KOUTINAS A.F., KRITSEPI M. AND MORAITOU K.T., (1996), Serum lipase activity in young dogs with acute enteritis or gastroenteritis. *Vet Clin Pathol.* **25**(2): p. 65-68.
50. REECE W.O., (2009), Digestion and Absorption, in *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*, W.O. Reece, Editor Iowa State University Press. p. 376-396.
51. RUAUX C.G. AND ATWELL R.B., (1999), Levels of total alpha-macroglobulin and trypsin-like immunoreactivity are poor indicators of clinical severity in spontaneous canine acute pancreatitis. *Res Vet Sci.* **67**(1): p. 83-7.
52. RUAUX C.G., LEE R.P. AND ATWELL R.B., (1999), Detection and measurement of canine alpha-macroglobulins by enzyme immuno-assay. *Res Vet Sci.* **66**(3): p. 185-90.
53. SHARKEY L., GJEVRE K., HEGSTAD-DAVIES R., TORRES S. AND MUNOZ-ZANZI C., (2009), Breed-associated variability in serum biochemical analytes in four large-breed dogs. *Vet Clin Pathol.* **38**(3): p. 375-80.
54. SIMPSON K.W., BATT R.M., MCLEAN L. AND MORTON D.B., (1989), Circulating concentrations of trypsin-like immunoreactivity and activities of lipase and amylase after pancreatic duct ligation in dogs. *Am J Vet Res.* **50**(5): p. 629-32.
55. SIMPSON K.W., SIMPSON J.W., LAKE S., MORTON D.B. AND BATT R.M., (1991), Effect of pancreatectomy on plasma activities of amylase, isoamylase, lipase and trypsin-like immunoreactivity in dogs. *Res Vet Sci.* **51**(1): p. 78-82.
56. SINGH M.K. AND LAMB W.A., (2005), Idiopathic thrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels. *Aust Vet J.* **83**(11): p. 700-3.
57. SOLBERG H.E., (1983), The theory of reference values Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem.* **21**(11): p. 749-60.
58. SOLBERG H.E., (1994), Using a hospitalized population to establish reference intervals: pros and cons. *Clin Chem.* **40**(12): p. 2205-6.
59. SPILLMANN T., EIGENBRODT E. AND SZIEGOLEIT A., (1998), [Determination and clinical relevance of fecal pancreatic elastase in dogs]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere.* **26**(5): p. 364-8.
60. SPILLMANN T., WITTKER A., TEIGELKAMP S., EIM C., BURKHARDT E., EIGENBRODT E. AND SZIEGOLEIT A., (2001), An immunoassay for canine pancreatic elastase 1 as an indicator for exocrine pancreatic insufficiency in dogs. *J Vet Diagn Invest.* **13**(6): p. 468-74.
61. SPILLMANN T., HAPPONEN I., SANKARI S., WITTKER A., KAHKONEN T. AND WESTERMARCK E., (2004), Evaluation of serum values of pancreatic enzymes after endoscopic retrograde pancreatography in dogs. *Am J Vet Res.* **65**(5): p. 616-9.
62. STEINER J.M., GUMMINGER S.R., M. R.G. AND WILLIAMS D.A., (2001), Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity (cPLI) concentrations in dogs with exocrine pancreatic insufficiency [abstract]. *J Vet Intern Medicine.* **15**(3): p. 274.



63. STEINER J.M., R. F.D., GUMMINGER S.R. AND A. W.D., (2001), Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity (cPLI) in dogs with experimentally induced chronic renal failure [abstract]. *J Vet Intern Medicine*. **15**(3): p. 311.
64. STEINER J.M., BERRIDGE B.R., WOJCIESZYN J. AND WILLIAMS D.A., (2002), Cellular immunolocalization of gastric and pancreatic lipase in various tissues obtained from dogs. *Am J Vet Res*. **63**(5): p. 722-7.
65. STEINER J.M. AND WILLIAMS D.A., (2002), Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochimie*. **84**(12): p. 1245-53.
66. STEINER J.M., (2003), Diagnosis of pancreatitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **33**(5): p. 1181-1195.
67. STEINER J.M., TEAGUE S.R. AND WILLIAMS D.A., (2003), Development and analytic validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of canine pancreatic lipase immunoreactivity in serum. *Can J Vet Res*. **67**(3): p. 175-82.
68. STEINER J.M. AND WILLIAMS D.A., (2003), Development and validation of a radioimmunoassay for the measurement of canine pancreatic lipase immunoreactivity in serum of dogs. *Am J Vet Res*. **64**(10): p. 1237-41.
69. STEINER J.M., (2005), Canine Exocrine Pancreatic Disease, in *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, S.J. Ettinger and E.C. Feldman, Editors. Elsevier Health Sciences. p. 1482 - 1488.
70. STEINER J.M., (2006), Is it pancreatitis ? *Veterinary Medicine*. **Mar 1**.
71. STEINER J.M., RUTZ G.M. AND WILLIAMS D.A., (2006), Serum lipase activities and pancreatic lipase immunoreactivity concentrations in dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Am J Vet Res*. **67**(1): p. 84-7.
72. STEINER J.M., NEWMAN S., XENOULIS P., WOOSLEY K., SUCHODOLSKI J., WILLIAMS D. AND BARTON L., (2008), Sensitivity of serum markers for pancreatitis in dogs with macroscopic evidence of pancreatitis. *Vet Ther*. **9**(4): p. 263-73.
73. STEINER J.M., XENOULIS P.G., ANDERSON J.A., BARR A.C. AND WILLIAMS D.A., (2008), Serum Pancreatic Lipase Immunoreactivity Concentrations in Dogs Treated with Potassium Bromide and/or Phenobarbital. *Vet Ther*. **9**(1): p. 37-44.
74. STEINER J.M., (2009), Canine Pancreatic Disease, in *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, S.J. Ettinger and E.C. Feldman, Editors. Elsevier Health Sciences. p. 1695 - 1704.
75. STEINER J.M., TEAGUE S.R., LEES G.E., WILLARD M.D., WILLIAMS D.A. AND RUAUX C.G., (2009), Stability of canine pancreatic lipase immunoreactivity concentration in serum samples and effects of long-term administration of prednisone to dogs on serum canine pancreatic lipase immunoreactivity concentrations. *Am J Vet Res*. **70**(8): p. 1001-5.
76. STEINER. J. M., BROUSSARD. J., MANSFIELD. C.S., GUMMINGER. S. R. AND WILLIAMS D.A., (2001), Serum canine pancreatic lipase immunoreactivity (cPLI) concentrations in dogs with spontaneous pancreatitis [abstract]. *J Vet Intern Medicine*. **15**(3): p. 274.
77. STROMBECK D.R., FARVER T. AND KANAKO J.J., (1981), Serum amylase and lipase activities in the diagnosis of pancreatitis in dogs. *Am J Vet Res*. **42**: p. 1966-1970.
78. SUCHODOLSKI J., RUAUX C.G., STEINER J., COLLARD J., SIMPSON K. AND WILLIAMS D., (2001), Serum alpha1-proteinase inhibitor/trypsin complex as a marker for canine pancreatitis [abstract]. *J Vet Intern Medicine*. **15**(3): p. 273.
79. SUCHODOLSKI J.S., COLLARD J.C. AND STEINER J.M., (2001), Development and validation of an enzyme-linked immunoabsorbent assay for measurement of alpha1-proteinase inhibitor/trypsin complexes in canine sera [abstract]. *J Vet Intern Medicine*. **15**(3): p. 311.

80. TRIVEDI S., MARKS S.L., KASS P.H., LUFF J.A., KELLER S.M., JOHNSON E.G. AND MURPHY B., (2011), Sensitivity and specificity of canine pancreas-specific lipase (cPL) and other markers for pancreatitis in 70 dogs with and without histopathologic evidence of pancreatitis. *J Vet Intern Medicine*. **25**(6): p. 1241-7.
81. VENTRUCCI M., PEZZILLI R., GULLO L., PLATE L., SPROVIERI G. AND BARBARA L., (1989), Role of serum pancreatic enzyme assays in diagnosis of pancreatic disease. *Dig Dis Sci*. **34**(1): p. 39-45.
82. WASHABAU R.J., (2013), Pancreas, Structure and function, in *Canine and Feline Gastroenterology*, R.J. Washabau and M.J. Day, Editors. Elsevier Health Sciences. p. 799-803.
83. WATSON P.J., ROULOIS A.J., SCASE T., JOHNSTON P.E., THOMPSON H. AND HERRTAGE M.E., (2007), Prevalence and breed distribution of chronic pancreatitis at post-mortem examination in first-opinion dogs. *J Small Anim Pract*. **48**(11): p. 609-18.
84. WATSON P.J., ARCHER J., ROULOIS A.J., SCASE T.J. AND HERRTAGE M.E., (2010), Observational study of 14 cases of chronic pancreatitis in dogs. *Vet Rec*. **167**(25): p. 968-76.
85. WILLIAMS D.A. AND BATT R.M., (1983), Diagnosis of canine exocrine pancreatic insufficiency by the assay of serum trypsin-like immunoreactivity. *J Small Anim Pract*. (24): p. 583-8.
86. WILLIAMS D.M. AND BATT R.M., (1988), Sensitivity and specificity of radioimmunoassay or serum trypsin-like immunoreactivity for the diagnosis of canine exocrine pancreatic insufficiency. *J Am Vet Med Assoc*. **192**: p. 195-201.
87. WRIGHT Z., STEINER J., SUCHODOLSKI J., ROGERS K., BARTON C. AND BROWN M., (2009), A pilot study evaluating changes in pancreatic lipase immunoreactivity concentrations in canines treated with L-asparaginase (ASNase), vincristine, or both for lymphoma. *Can J Vet Res*. **73**(2): p. 103-10.
88. XENOULIS P.G., SUCHODOLSKI J.S., LEVINSKI M.D. AND STEINER J.M., (2008), Serum liver enzyme activities in healthy Miniature Schnauzers with and without hypertriglyceridemia. *J Am Vet Med Assoc*. **232**(1): p. 63-7.
89. XENOULIS P.G. AND STEINER J.M., (2012), Canine and feline pancreatic lipase immunoreactivity. *Veterinary Clinical Pathology*. **41**(3): p. 312-324.
90. XENOULIS P.G. AND STEINER J.M., (2013), Pancreas, Diagnostic evaluation of the pancreas, in *Canine and Feline Gastroenterology*, R.J. Washabau and M.J. Day, Editors. Elsevier Health Sciences. p. 803-812.
91. XENOULIS P.G. AND STEINER J.M., (2013), Pancreas, Necrosis and inflammation : canine, in *Canine and Feline Gastroenterology*, R.J. Washabau and M.J. Day, Editors. Elsevier Health Sciences. p. 812-821.
92. ZALDIVAR-LOPEZ S., MARIN L.M., IAZBIK M.C., WESTENDORF-STINGLE N., HENSLEY S. AND COUTO C.G., (2011), Clinical pathology of Greyhounds and other sighthounds. *Vet Clin Pathol*. **40**(4): p. 414-25.

## ANNEXES

ANNEXE 1 : Synthèse comparative des études sur les marqueurs de cytolyse pancréatique

ANNEXE 2 : Résultats bruts pour les différents analytes étudiés

ANNEXE 3 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de cPLI : histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne

ANNEXE 4 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de TLI : histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne



## ANNEXE 1 : Synthèse comparative des études sur les marqueurs de cytolyse pancréatique

Etude	Type	Nombre de chiens	Critères d'inclusion	Classification	Méthode de diagnostic	Lésions à l'histologie	Lésions macroscopiques	Autre EC disponible	Marqueur	Seuil / IR	Sensibilité (%)	Spécificité (%)				
Neilson-Carley et al.	2011 R	n = 64	Aucun signe clinique ou histologique évocateur de pancréatite	Euthanasie ou mort pour diverses raisons (17/64)	ND	Nécropsie	Différence significative entre groupe "sain" et groupe avec lésions macroscopiques sur divers paramètres	Pancréas complet < 6h post mortem	Lésions macroscopiques à l'autopsie (20/64)	Examen clinique avant euthanasie (17 et 27)	Spec cPL	> 200 µg/L	Pancréas avec infiltration neutrophilique	NE	95	
				Bonne santé (27/64)								Section tous les 1 cm (44/67) ou 2 cm (20/67)	Pas d'information pour les 44 autres	> 400 µg/L	Pancréas avec infiltration neutrophilique	NE
				Lésions macroscopiques et au moins un signe clinique (20/64)		2 chiens exclus car aucune lésion histologique										
Kook et al.	2014 R	n = 142	Suspicion de pancréatite et au moins 2 signes cliniques (vomissement, anorexie, douleur abdominale, léthargie)	ND	ND	Echographique (51/152)	Seulement disponible chez 4 animaux	ND	ND	Echographie pancréas (110/142) Histologie (4 biopsies et 1 nécropsie)	Lipase - DGGR	> 108 UI/L	90.2	40.7		
												>216 UI/L	76.5	59.3		
												Spec cPL	> 200 µg/L	80.4	45.8	
												> 400 µg/L	68.6	57.6		
Jacobs et al.	1988 P	n = 161	Normal (75/161) Atteinte intestinale (14/161) Atteinte hépatique (35/161) Atteinte rénale (16/161) EPI (10/161) Pancréatite (11/161)	Grave œdémateuse (3/11) Nécrosante et/ou hémorragique (8/11)	ND	Présence de lésions macroscopiques sur le pancréas	Localisées au pancréas uniquement	ND	Lésions macroscopiques (11/11) (œdème pancréatique, nécrose, et/ou hémorragie)	Examen clinique Hématologie Biochimie Biopsies ou autopsie pour confirmer l'absence de pancréatite	Amylase	ND	78	77		

## ANNEXE 1 : Synthèse comparative des études sur les marqueurs de cytolysse pancréatique (suite)

Etude	Type	Nombre de chiens	Critères d'inclusion	Classification	Méthode de diagnostic	Lésions à l'histologie	Lésions macroscopiques	Autre EC disponible	Marqueur	Seuil / IR	Sensibilité (%)	Spécificité (%)			
McCord et al.	2012	M	n = 84	Signes cliniques compatibles	pas d'évidence de AP (51/84)	Aiguë	Consensus de 4 experts sur	3/84	ND	ND	Hématologie	Lipase	< 750 UI/L	49	91
				avec AP (57/84)	probablement pas AP (13/84)		Données cliniques et d'imagerie		Biochimie standard	Amylase	> 1240 UI/L	54	78		
				contrôle (27/84)	peut-être AP (9/83)		Résultats Spec et SNAP masqués		Analyse d'urine	SNAP cPL	"anormal"	93	74		
					probablement AP (8/84)				Echographie abdominale	Spec cPL	> 200 µg/L	90	72		
				AP (3/84)				Histopathologie		> 400 µg/L	75	78			
Graca et al.	2008	R	n = 30	Vomissement, diarrhée, douleur abdominale	Pancréatite aiguë (15/30)	Aiguë	3 critères :	ND	ND	ND	Echographie	Lipase - 1.2 DiG	30 - 699 UI/L	60	73
					Pas de pancréatite aiguë (15/30)		au moins 1 motif de consultation					Lipase - DGGR	6 - 120 UI/L	93.3	53.3
Haworth et al.	2014	P	n = 38	Présence d'un diagnostic final	Pancréatite aiguë (11/38)	Aiguë	Echographie			Echographie en faveur AP pour les 11 chiens	Examen clinique	SNAP cPL	"anormal"	82	59
					Autre maladie (27/38)		Consensus 3 auteurs pour diagnostic final sans les résultats des SNAP et Spec		Autopsie (1/11 et 5/27)	historique	Spec cPL	> 400 µg/L	70	77	
							en accord avec le diagnostic établi		Hématologie						
									Biochimie						
									Echographie abdominale						



## ANNEXE 1 : Synthèse comparative des études sur les marqueurs de cytolysse pancréatique (suite)

Etude	Type	Nombre de chiens	Critères d'inclusion	Classification	Méthode de diagnostic	Lésions à l'histologie	Lésions macroscopiques	Autre EC disponible	Marqueur	Seuil / IR	Sensibilité (%)	Spécificité (%)											
Trivedi et al.	2001	P	n = 70	Participation volontaire des propriétaires à l'étude, Inclusion après euthanasie pour raisons variées	Légère (56/70)	Aiguë et Chronique	Nécropsie	63/70	Pancréas complet, <4h post mortem	Lésions macroscopiques (12/70)	Echographie abdominale (8/70) <24h	Lipase	> 750 UI/L	Pancréatite légère	54	43							
					Modérée (6/70)	Aiguë et Chronique						sections tous les 2 cm	Biochimie	Amylase	> 1240 UI/L	Pancréatite modérée à grave	71	43					
					Grave (1/70)	Aiguë et Chronique						Biopsies estomac (44/70), foie (62/70) et intestin grêle (51/70)	Amylase	> 1240 UI/L	Pancréatite légère	7	100						
					Absence de lésions histologiques (7/70)							Autopsie complète (69/70)	cTLI	> 35 µg/L	Pancréatite modérée à grave	14	100						
															Pancréatite légère	30	100						
															Pancréatite modérée à grave	29	100						
															Pancréatite légère	43	86						
															Pancréatite modérée à grave	71	86						
															Pancréatite légère	> 400 µg/L	21	100					
															Pancréatite modérée à grave	71	100						
Mansfield et al.	2011	P	n = 61	Signes cliniques compatibles avec inflammation pancréatique incluant vomissement et douleur abdominale	Aiguë grave (23/61)	Aiguë et chronique	Echographie et/ou	ND	ND	ND	Echographie abdominale	cPE-1	> 17.24 ng/L	Toutes formes	61.36	91.67							
					Aiguë modérée (11/61)									Histologie	Histologie	Aiguë	65.85	91.67					
					Crise aiguë sur pancréatite chronique (7/11)											Aiguë grave	78.26 <sup>2</sup>	91.67					
					Chronique (3/61)														cPE-1	> 5.5 ng/L	Toutes formes	81.82	50
					Carcinome (5/61)																Aiguë	85.37	50
					Affection non pancréatique (12/61)																Aiguë grave	82.61	50



## ANNEXE 1 : Synthèse comparative des études sur les marqueurs de cytolyse pancréatique (suite)

Etude	Type	Nombre de chiens	Critères d'inclusion	Classification	Méthode de diagnostic	Lésions à l'histologie	Lésions macroscopiques	Autre EC disponible	Marqueur	Seuil / IR	Sensibilité (%)	Spécificité (%)					
Steiner et al.	2008 R	n = 22	Lésions macroscopiques à l'autopsie (22/22)	Légère (81.8%)	Chronique	Nécropsie	22/22	Pancreas complet, <6h post mortem	Lésions macroscopiques à l'autopsie (22/208)	Echographie abdominale (9/22)	Lipase	65 - 691 UI/L	31.8	NE			
				Modérée (18.2%)							Lipase	> 3 fois la limite haute de l'IR	13.6	NE			
				Grave (0%)							Amylase	454 - 1 380 UI/L	40.9	NE			
				Absence de lésions histologiques (0%)							Amylase	> 3 fois la limite haute de l'IR	18.2	NE			
				cTLI							5 -35 µg/L	36.4	NE				
				Spec cPL							> 400 µg/L	63.6	NE				
Watson et al.	2010 P	n = 14	Signes cliniques compatibles	Légère à modérée (5/14)	Chronique	Histologie	14/14	3 prélèvements	Description macroscopique pour 13/14 cas	Hématologie	Lipase	0 - 250 UI/L	44	NE			
			avec pancréatite chronique	Grave (9/14)							détails cliniques non donnés,	(biopsies ou lors d'autopsie)	Biochimie complète	> 3 fois la limite haute de l'IR	28	NE	
			et confirmation histologique								connaissance de l'existence	(au sein des lobes gauche et droit, du corps)	Echographie du pancréas	Amylase	167 - 1126 UI/L	67	NE
											d'une pancréatite chronique	Conservation variable	Recherche de maladie concomitante	> 3 fois la limite haute de l'IR	14	NE	
													Histologie	TLI	> 35 ng/mL	17	NE
														cPL ELISA	> 102 ng/mL	58	NE
						> 200 ng/mL	26	NE									

## ANNEXE 1 : Synthèse comparative des études sur les marqueurs de cytolysse pancréatique (suite)

Etude	Type	Nombre de chiens	Critères d'inclusion	Classification		Méthode de diagnostic	Lésions à l'histologie	Lésions macroscopiques	Autre EC disponible	Marqueur	Seuil / IR	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	
Bostrom et al.	2012 ND	n = 61	Lésions histologiques de pancréatites (fibrose ou atrophie)	Pancréatite chronique clinique (40/61)	Chronique	Nécropsie	61/61	ND	ND	Historique médical	cPL ELISA	> 102.1 µg/L	67	NE
				Pancréatite chronique fortuite (18/61)					Biochimie					
				Non classable (3/61)					Echographie abdominale (37/61)					
									Spec cPLI (9/61)					

Abréviations : AP : Pancréatite Aiguë, ND : Non décrit, P : Prospective, R : Rétrospective, M : Multicentrique, IR : Intervalle de référence, EC : Examen complémentaire, PT : Temps de Quick, aPTT : Temps de céphaline activée

Document établi à partir de [3, 17, 19, 21, 24, 26, 36, 37, 39, 42, 72, 80, 84]

ANNEXE 2 : Résultats bruts pour les différents analytes étudiés

<b>Numéro de chien</b>	<b>Lipase (UI/L)</b>	<b>cPLI (µg/L)</b>	<b>TLI (µg/L)</b>
25	5420	84	17.6
26	5674	355	16
27	1283	33	9.3
28	794	51	13.7
29	4834	268	33.6
30	4248	29	15.5
31	5738	84	24
32	15000	87	18.8
33	15368	29	14
34	5336	31	33.4
37	12564	274	15
38	4480	30	12.4
39	6032	364	22.3
40	6078	173	11.1
41	8824	90	10.1
42	4502	114	14
44	750	80	11.4
45	4930	117	13.9
46	1194	59	14
47	2745	148	14.9
48	1234	44	10.6
49	1109	43	13.6
50	4007	135	13.3
51	2826	78	11.1
52	3795	612	18.8
53	1094	39	20.8
54	3371	112	14.5
55	2821	174	19
56	2446	58	11.8
57	2860	104	12.4
59	3458	41	16.5
60	2081	43	10.6
61	2542	121	17.4
62	1367	66	9.9
63	2872	30	11.1
64	3576	84	9.9
65	2358	57	17.3
66	1233	110	15.2
67	2546	88	22.9

68	1213	86	13.7
69	3388	212	18.6
70	1093	47	43.8
71	2928	649	124.4
72	1116	96	8.3
73	2156	94	11.7
74	3574	222	25.1
75	1100	44	20.2
76	2942	44	12.7
77	889	50	12.7
78	3839	35	8.8
79	1661	45	12.4
80	2747	105	14.4
81	3143	88	16.5
82	1245	113	19.9
83	2438	32	18.6
84	2028	41	26.1
85	2715	98	18.1
87	2466	90	11.3
88	3659	413	127.5
89	826	106	16.7
90	1260	83	13.5
91	1074	160	28.8
92	1558	126	94.2
93	2338	128	25.7
94	2820	48	32.4
95	1501	43	14.1
96	3223	264	20.8
97	3043	153	37.1
98	4413	55	15.5
99	2704	56	18.2
100	2347	61	17.2
101	5354	70	12.7
102	2745	35	9.6
103	722	58	17.9
104	3497	51	13.2
105	3407	145	19.3
106	1412	100	16.3
107	2146	85	16.3
108	1425	45	24
109	1484	287	12.5
110	2361	35	9.6
112	979	53	19

113	2032	57	12
114	3205	78	16
115	2814	33	17.2
116	2144	48	13
117	4086	114	23.1
118	1182	75	11.1
119	2898	40	9.5
120	871	154	21

ANNEXE 3 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de cPLI : histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne

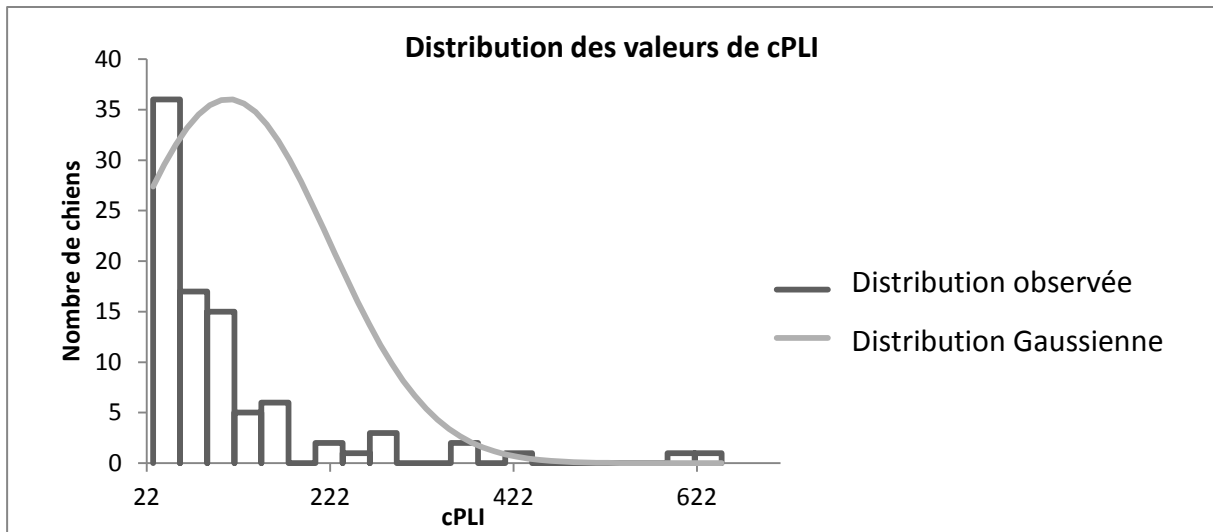


Figure 6 : Histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne pour le cPLI

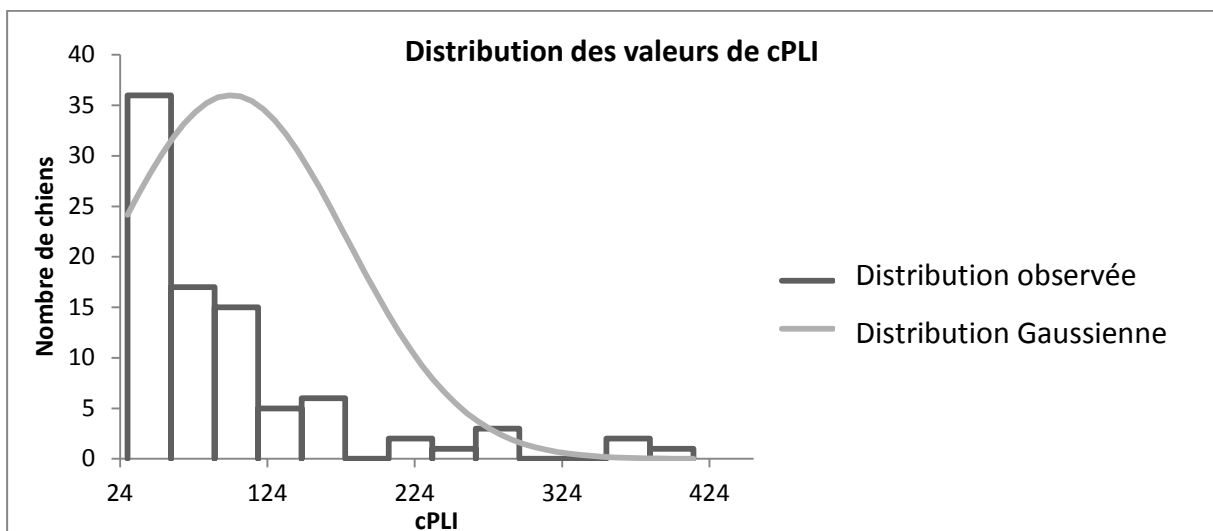
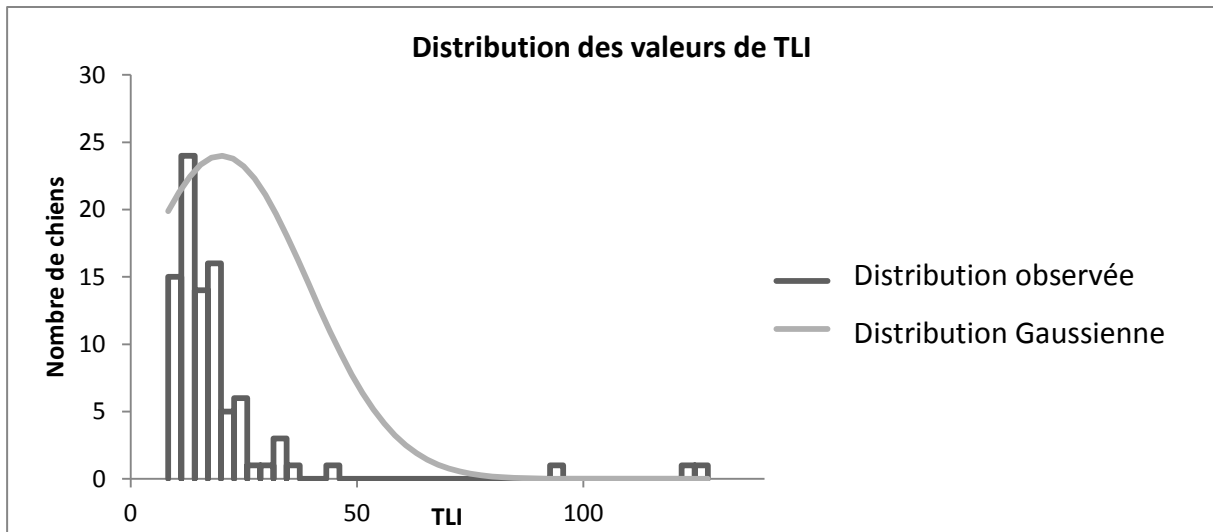
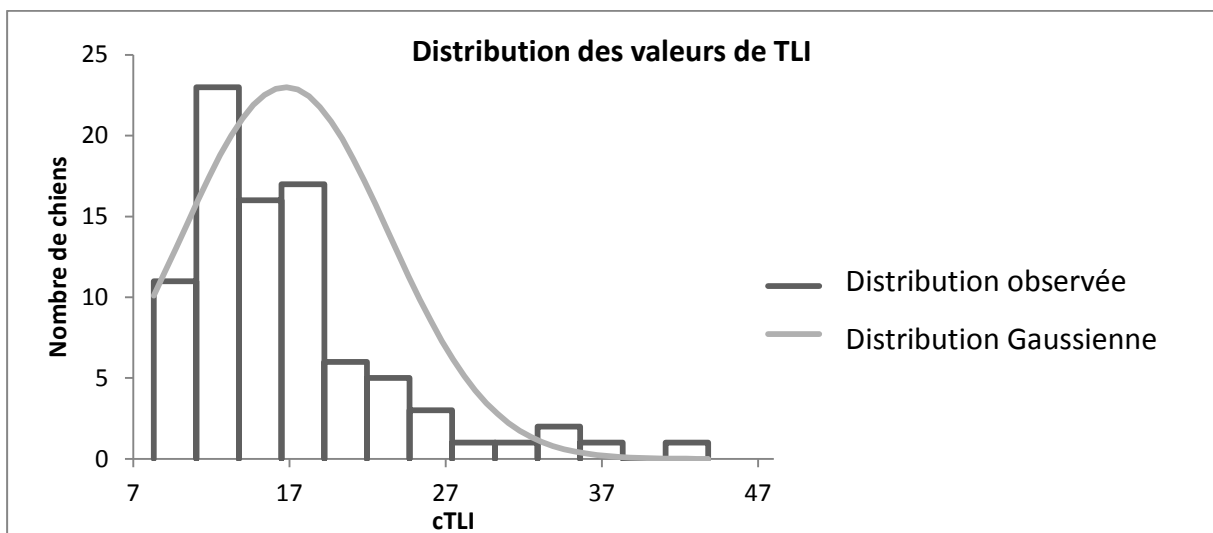


Figure 7 : Histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne pour le cPLI, après exclusion des valeurs aberrantes

**ANNEXE 4** : Représentation graphique de la distribution des valeurs de TLI : histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne



**Figure 8** : Histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne pour le TLI



**Figure 9** : Histogramme de distribution des valeurs observées et distribution Gaussienne pour le TLI, après exclusion des valeurs aberrantes







Toulouse, 2014

NOM : ROCHER

PRENOM : Clément

**TITRE : PARTICULARITES DES INTERVALLES DE REFERENCE DE LA LIPASE, DE LA LIPASE SPECIFIQUE PANCREATIQUE CANINE (cPLI) ET DE L'IMMUNOREACTIVITE DE LA TRYPSINE ET DU TRYPSINOGENE (TLI) CHEZ LE DOGUE DE BORDEAUX.**

RESUME : Il a récemment été publié que la limite supérieure de l'intervalle de référence (IR) de l'activité de la lipase conventionnelle (LC) plasmatique chez le Dogue de Bordeaux (DDB) est le triple de celle fournie par le fabricant de l'analyseur (Lavoué et al, 2013). La présente étude s'intéresse aux concentrations de l'immunoréactivité de la lipase spécifique pancréatique canine (cPLI) et de l'immunoréactivité de la trypsine et du trypsinogène (TLI) chez le même groupe de chiens.

Quatre-vingt-dix DDB adultes cliniquement sains et âgés de 1 à 10 ans ont été inclus. L'activité de la LC et les concentrations en cPLI et en TLI ont été dosées respectivement sur plasma hépariné et sur sérum. La corrélation entre les variables cPLI et TLI a été évaluée avec le coefficient de corrélation de Spearman. Les limites des IR et leurs intervalles de confiance à 90% ont été déterminés grâce à une méthode non paramétrique (Reference Value Advisor, V 2.1).

Les valeurs médianes (minimum et maximum) de l'activité de la LC, des concentrations en cPLI et TLI sont respectivement 2 730 UI/L (722 – 15 368), 83.5 µg/L (29 - 649) et 15.5 µg/L (8.3 - 127.5). Les limites des IR spécifiques des concentrations en cPLI et en TLI pour le DDB sont respectivement 29.2 - 362 µg/L et 8.9 - 36.4 µg/L.

Il ne semble pas que l'augmentation des valeurs de LC observée chez le DDB soit directement imputable à une origine pancréatique. Ceci est la première étude à déterminer les IR spécifiques des marqueurs pancréatiques chez une race canine. L'utilisation de l'intervalle spécifique pour la concentration en cPLI semble justifiée.

MOTS-CLES : chien, dogue de Bordeaux, intervalle de référence, pancréas, lipase, cPLI, TLI

---

**TITLE : CHARACTERISTICS OF LIPASE, CANINE PANCREATIC LIPASE IMMUNOREACTIVITY (cPLI) AND TRYPSIN-LIKE IMMUNOREACTIVITY (TLI) REFERENCE INTERVALS IN THE DOGUE DE BORDEAUX (FRENCH MASTIFF).**

ABSTRACT : It has recently been reported that the upper limit of the reference interval (RI) for plasma lipase activity in the Dogue de Bordeaux (DDB) is 3 times higher than the manufacturer's RI (Lavoué et al, 2013). The goal of this study was to document canine pancreatic lipase immunoreactivity (cPLI) and trypsin-like immunoreactivity (TLI) concentrations in the same group of dogs.

Ninety clinically healthy adult DDB dogs aged 1 to 10 years were included. Blood was sampled after a 12 hours fast. Lipase activity and cPLI and TLI concentrations were measured in plasma and serum, respectively. Correlations between lipase and cPLI or TLI were assessed with the Spearman's rank correlation coefficient. RI limits and their 90% confidence intervals were determined using a non parametric method (Reference Value Advisor, V 2.1).

Median (minimum to maximum) values for lipase activity, cPLI and TLI concentrations were 2 730 UI/L (722 – 15 368), 83.5 µg/L (29 - 649) and 15.5 µg/L (8.3 - 127.5), respectively. There was no significant correlation between plasma lipase activity and neither serum cPLI nor serum TLI concentrations. Breed-specific RI for cPLI and TLI concentrations in DDB were 29.2 - 362 µg/L and 8.9 – 36.4 µg/L, respectively.

Results suggest that the high values of lipase activity observed in healthy DDB dogs are due to a non-pancreatic enzyme. This study is the first to report breed-specific RI for canine pancreatic markers and it may be appropriate to use the RI determined for cPL in the DDB.

KEY WORDS : dog, French Mastiff, reference intervals, pancreas, lipase, cPLI, TLI