

# VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE IMMUNOTURBIDIMETRIQUE DES D-DIMERES CHEZ LE CHIEN

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2002  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Pierre, Pascal, Jean MENAUT**  
Né, le 4 juillet 1978 à BORDEAUX (Gironde)

---

**Directeur de thèse : Mlle le Docteur Armelle DIQUELOU.**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Jacques PRIS**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :  
**Mlle Armelle DIQUELOU**  
**M. Jean-François GUELF**

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

MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur	: M.	<b>P. DESNOYERS</b>
Directeurs honoraires.....	: M.	<b>R. FLORIO</b>
	M.	<b>R. LAUTIE</b>
	M.	<b>J. FERNEY</b>
	M.	<b>G. VAN HAVERBEKE</b>
Professeurs honoraires.....	: M.	<b>A. BRIZARD</b>
	M.	<b>L. FALIU</b>
	M.	<b>C. LABIE</b>
	M.	<b>C. PAVAU</b>
	M.	<b>F. LESCURE</b>
	M.	<b>A. RICO</b>
	M.	<b>A. CAZIEUX</b>
	Mme	<b>V. BURGAT</b>
	M.	<b>D. GRIESS</b>

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **CABANIE Paul**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **CHANTAL Jean**, *Pathologie infectieuse*
- M. **DARRE Roland**, *Productions animales*
- M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **GUELFY Jean-François**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

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

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **BODIN ROZAT DE MANDRES NEGRE Guy**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **EECKHOUTTE Michel**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- 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. **MILON Alain**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

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

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les industries agro-alimentaires*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **KOLF-CLAUW Martine**, *Pharmacie -Toxicologie*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

**PROFESSEUR ASSOCIE**

- M. **HENROTEAUX Marc**, *Médecine des carnivores*
- M. **TAMZALI Youssef**, *Clinique équine*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

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

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*

**MAITRES DE CONFERENCES 1<sup>ère</sup> CLASSE**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **BOUCRAUT-BARALON Corine**, *Pathologie infectieuse*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*  
Mme **BRET-BENNIS Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
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. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **MESSUD-PETIT Frédérique**, *Pathologie infectieuse*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
Mme **RAYMOND-LETRON Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*  
Mlle **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*  
M. **VALARCHER Jean-François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

**MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées Alimentaires d'Origine Animale*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
Mlle **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mme **COLLARD-MEYNAUD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*  
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Productions animales*  
Mlle **HAY Magali**, *Zootecnie*  
M. **MARENDA Marc**, *Pathologie de la Reproduction*  
M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*

**MAITRES DE CONFERENCES 2<sup>e</sup> CLASSE**

- M. **GRANDJEAN Christophe**, *Gestion de la santé en élevage des ruminants*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- Mme **MEYNADIER-TROEGELER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*

**A NOTRE JURY DE THESE :**

**A Monsieur le Professeur PRIS**

Professeur des Universités  
Praticien hospitalier  
Hématologie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.  
Hommage respectueux.

**A Mademoiselle le Docteur DIQUELOU**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Pathologie médicale des carnivores et équidés

Qui a inspiré et guidé notre travail et nous a toujours soutenu pendant la réalisation de cette thèse.  
Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère gratitude.

**A Monsieur le Professeur GUELFY**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
Pathologie médicale des carnivores et équidés

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.  
Qu'il veuille bien accepter le témoignage de notre profond respect.

**Au personnel du laboratoire d'hémostase de l'Hôpital Purpan, en particulier Mme Mac Nulty**

Qui nous a accueillis chaleureusement et nous a permis de réaliser l'étude expérimentale dans des conditions optimales.  
Sincères remerciements.

**A mes parents**, qui ont toujours su me soutenir tout au long de ma scolarité.  
Qu'ils trouvent dans ce travail le témoignage de ma reconnaissance.

**A mes grands parents**, pour leur infinie gentillesse, leur patience et leur énergie.

**A ma grand-mère**, qui nous a quittés trop tôt.

**A Fick, Babar et Julio**, pour ces belles années partagées sous le même toit.

**A tous mes amis**, Niçoises, Claudettes, Brassac, Doudou, Aurélie, Maria, Lolo, Kiki, Guillaume, Mă der, Arnaud, Stéphanie, Guilain, Cédric, Peyo et tous les autres pour m'avoir fait passer d'aussi bons moments. J'espère que les meilleurs sont encore à venir.

**A Odile.**

# **TABLE DES MATIERES**

<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	11
<b><u>PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u></b> .....	13
<b>I.Rappels de physiologie de l'hémostase</b> .....	13
I.1. L'hémostase primaire.....	13
<i>I.1.1. Temps vasculaire</i>	
<i>I.1.2. Temps plaquettaire</i>	
I.2. L'hémostase secondaire : la coagulation plasmatique.....	16
<i>I.2.1. La formation de thrombine</i>	
<i>I.2.2. La formation de fibrine</i>	
<i>I.2.3. Coagulation in vivo et boucles de rétroactivation</i>	
<i>I.2.4. Régulation de la coagulation</i>	
I.3. La fibrinolyse.....	19
<i>I.3.1. Activation du plasminogène</i>	
<i>I.3.2. Contrôle de la fibrinolyse</i>	
<i>I.3.3. Effets de la plasmine : formation des PDF et des D-Dimères</i>	
<b>II.La CIVD et son diagnostic</b> .....	24
II.1. Etiopathogénie et symptômes de la CIVD.....	24
<i>II.1.1. Etiopathogénie</i>	
<i>II.1.2. Symptômes</i>	
II.2. Diagnostic de la CIVD.....	30
<i>II.2.1. Suspicion clinique</i>	
<i>II.2.2. Diagnostic de laboratoire</i>	
<i>II.2.3. Diagnostic différentiel</i>	
<b>III.Le dosage des D-Dimères en hémostase</b> .....	38
III.1. Rappels sur la valeur diagnostique d'un test biologique.....	38
III.2. Intérêt du dosage des D-Dimères en tant que marqueur de fibrinolyse.....	38
<i>III.2.1. D-Dimères et diagnostic des CIVD</i>	

*III.2.2. D-Dimères et diagnostic des thromboses veineuses et embolies pulmonaires*

III.3. Limites du dosage des D-Dimères.....	40
III.4. Méthodes de dosage des D-Dimères.....	41
III.5. Données actuelles sur l'utilisation du test des D-Dimères en médecine vétérinaire.....	42

**PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE**..... 44

**I.Introduction : But de l'étude**..... 44

**II.Matériel et méthodes**..... 45

II.1. Matériel..... 45

*II.1.1. Récolte des échantillons*

*II.1.2. Automate de dosage des D-Dimères par immunoturbidimétrie*

II.2. Méthodes..... 46

*II.2.1. Répétabilité*

*II.2.2. Reproductibilité*

*II.2.3. Linéarité*

*II.2.4. Recouvrement*

*II.2.5. Effet des conditions de conservation*

**III.Résultats**..... 49

III.1. Répétabilité..... 49

III.2. Reproductibilité..... 50

III.3. Linéarité..... 51

III.4. Recouvrement..... 52

III.5. Effet des conditions de conservation..... 53

**II.Discussion**..... 54

IV.1. Rappels sur les qualités métrologiques des techniques analytiques..... 54

IV.2. Précision de la méthode..... 56

IV.3. Linéarité..... 57

IV.4. Recouvrement..... 58

IV.5. Effet des conditions de conservation.....	58
IV.6. Perspectives.....	59

<b><u>CONCLUSION</u></b> .....	61
--------------------------------	----

<b><u>ANNEXES</u></b> .....	63
-----------------------------	----

<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	65
-----------------------------------	----

**Liste des documents placés en annexe :**

- Annexe 1 : Répétabilité – Données brutes.
- Annexe 2 : Reproductibilité – Données brutes.
- Annexe 3 : Linéarité – Données brutes.
- Annexe 4 : Effet des cycles décongélation/recongélation – Données brutes.
- Annexe 5 : Effet de la conservation à température ambiante – Données brutes.

# **TABLE DES ILLUSTRATIONS**

## **Schémas**

<u>Figure 1</u> : L'hémostase primaire.....	15
<u>Figure 2</u> : L'hémostase secondaire.....	18
<u>Figure 3</u> : Schéma de l'activation de la fibrinolyse.....	20
<u>Figure 4</u> : Effets de la plasmine sur la molécule de fibrinogène et la fibrine.....	23
<u>Figure 5</u> : Etiopathogénie de la CIVD.....	26
<u>Figure 6</u> : Diagnostic différentiel lors de troubles de la coagulation.....	37
<u>Figure 7</u> : Répétabilité du dosage des D-Dimères.....	49
<u>Figure 8</u> : Reproductibilité du dosage des D-Dimères.....	50
<u>Figure 9</u> : Linéarité de la technique.....	51
<u>Figure 10</u> : Recouvrement.....	52
<u>Figure 11</u> : Effet des cycles de congélation/décongélation sur les concentrations en D-Dimères.....	53
<u>Figure 12</u> : Effet de la conservation à température ambiante.....	54

## **Tableaux**

<u>Tableau 1</u> : Causes de CIVD chez le chien et le chat.....	28
<u>Tableau 2</u> : Etiologie des thrombopénies chez les carnivores domestiques.....	36
<u>Tableau 3</u> : Répétabilité du dosage des D-Dimères.....	49
<u>Tableau 4</u> : Reproductibilité du dosage des D-Dimères.....	50
<u>Tableau 5</u> : Recouvrement.....	52
<u>Tableau 6</u> : Effet des cycles décongélation / recongélation sur les concentrations en D-Dimères.....	54

## **INTRODUCTION**

La Coagulation Intravasculaire Disséminée (CIVD) constitue un trouble grave de la coagulation, compliquant l'évolution clinique de nombreuses affections comme les sepsis, les néoplasmes, les coups de chaleurs ou les pancréatites. Il s'agit d'une hyperactivation pathologique de la coagulation entraînant le dépôt de multiples caillots sanguins dans toute la circulation. Parallèlement, l'organisme se défend en tentant de lyser ces caillots de fibrine par le biais du système fibrinolytique. Cependant, malgré cette réponse, tous les acteurs de la coagulation sont petit à petit consommés par cette hyperactivation et des hémorragies importantes peuvent apparaître et conduire à la mort du patient si le diagnostic n'est pas posé suffisamment tôt.

La clinique étant équivoque, le diagnostic de ce syndrome est souvent difficile et fait obligatoirement appel à un ensemble de tests de laboratoire, dont les marqueurs de la fibrinolyse qui constituent une aide importante au diagnostic. Parmi eux, les Produits de Dégénération de la Fibrine et du fibrinogène (PDF) sont actuellement utilisés en routine pour diagnostiquer les CIVD chez le chien. Ces kits de dosages utilisant des anticorps anti-PDF ne font pas la différence entre les produits de la dégradation de la fibrine seule (mis en jeu lors de CIVD) et ceux du fibrinogène. En revanche, de nouveaux tests utilisant des anticorps reconnaissant des produits de dégradation de la fibrine insoluble sont plus spécifiques d'une fibrinolyse secondaire à la coagulation et permettent le distinguo avec une fibrinogénolyse primitive. Le test le plus utilisé pour détecter ces produits de dégradation de la fibrine est le dosage des D-Dimères. En médecine humaine, du fait de ses performances supérieures, ce test a supplanté celui des PDF et cet engouement a suscité l'intérêt des hématologistes vétérinaires désireux de valider cette technique chez le chien. Quelques études ont permis de valider des méthodes de dosage semi-quantitatif des D-Dimères mais une seule méthode de dosage quantitatif a été approuvée à ce jour pour l'espèce canine et des travaux sont encore nécessaires avant de pouvoir utiliser ce test en pratique courante.

L'objet de notre étude expérimentale sera donc de valider une technique immunoturbidimétrique de dosage quantitatif des D-Dimères en utilisant un kit jamais testé chez le chien, le Sta-Liatest D-Di commercialisé par STAGO (Asnières, France). Après quelques rappels de physiologie de l'hémostase, nous aborderons la CIVD et les problèmes posés par son diagnostic avant de faire le point sur l'utilisation du test des D-Dimères en médecine humaine et vétérinaire. Cette partie bibliographique nous amènera à présenter notre étude expérimentale en détaillant la méthodologie employée avant de discuter les résultats obtenus.

# **PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. RAPPELS DE PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE**

A l'état normal, le sang circule dans les artères, les veines et les capillaires. L'hémostase se définit comme l'ensemble des phénomènes biologiques qui font cesser spontanément une hémorragie (11). Elle permet également le maintien de l'intégrité vasculaire et de la fluidité sanguine, toutes deux indispensables à la circulation sanguine. En effet, la formation anormale de thrombi peut avoir des conséquences non négligeables sur les fonctions vitales.

Quand un vaisseau est endommagé, la perte sanguine doit être réduite par la formation d'un caillot au site lésé. Ceci est permis dans un premier temps par la formation d'un clou plaquettaire, ou *thrombus blanc* (**hémostase primaire**) puis par sa consolidation par de la fibrine, produit final de la cascade de coagulation (**hémostase secondaire**). Enfin, il est très important que le vaisseau réparé retrouve son état initial après dissolution du caillot, permettant ainsi le rétablissement d'un flux sanguin normal. Il s'agit de la troisième et dernière étape, la **fibrinolyse** qui permet la lyse du caillot par action de la plasmine.

Il existe un équilibre permanent entre l'activation et l'inhibition de la coagulation plasmatique : on parle de *balance hémostatique*. Cet équilibre peut être rompu dans un sens ou dans l'autre et conduire à des états pathologiques appelés troubles de l'hémostase ou coagulopathies.

### **I.1. L'hémostase primaire (Figure 1) (12, 28, 46)**

On regroupe sous ce terme l'interaction entre les plaquettes, l'endothélium vasculaire endommagé et des protéines adhésives, conduisant à la formation d'un thrombus blanc, essentiellement composé de plaquettes. Elle trouve son efficacité physiologique maximale dans les vaisseaux de petites tailles (veinules, capillaires), permettant une hémostase adéquate. En revanche, dans les vaisseaux où le flux et la pression sont plus importants, une stabilisation de ce caillot par de la fibrine formée lors de l'hémostase secondaire est

indispensable. Il est par ailleurs intéressant de constater que les thrombi veineux sont essentiellement formés de fibrine car les plaquettes, du fait de phénomènes de convection insuffisants, adhèrent très peu au sous-endothélium de ces vaisseaux.

### I.1.1. *Temps vasculaire*

Lors de brèche vasculaire, les cellules endothéliales libèrent des médiateurs chimiques (endothéline, leucotriènes) provoquant une vasoconstriction immédiate qui permet de ralentir le flux sanguin et de favoriser l'adhésion plaquettaire tout en diminuant les pertes sanguines.

### I.1.2. *Temps plaquettaire (12, 46)*

- L'adhésion plaquettaire :

La mise à nu du sous-endothélium permet l'adhésion plaquettaire. Lors de cette étape, les plaquettes adhèrent au sous-endothélium par l'intermédiaire du facteur von Willebrand (FvW) et du collagène sous-endothélial. Cette adhésion entraîne l'activation des plaquettes.

- L'activation plaquettaire :

L'activation entraîne de profonds bouleversements :

- Les plaquettes activées changent de forme et passent d'une forme discoïde à une forme ronde avec de nombreux pseudopodes, permettant une importante augmentation de surface de contact.

- L'activation expose de nouveaux récepteurs membranaires au fibrinogène et au FvW, ce qui permettra la formation de ponts de fibrinogène entre les plaquettes lors de l'agrégation.

- Le contenu des granules plaquettaires (notamment Adénosine DiPhosphate (ADP),  $Ca^{2+}$ , FvW, fibrinogène) est libéré dans l'environnement et active d'autres plaquettes qui, ainsi recrutées, viennent s'agréger aux plaquettes déjà attachées au sous-endothélium.

- La phospholipase A2 est activée et conduit à la métabolisation des phospholipides en thromboxane A2 (TX A2) qui de même que l'ADP induit l'agrégation plaquettaire et le recrutement des plaquettes circulantes.

- Par l'intermédiaire du  $Ca^{2+}$  et du fibrinogène, un réseau plaquettaire se dessine, auto-entretenu par la libération ou la formation de nouveaux activateurs plaquettaires (TX A2, ADP, thrombine).

Figure 1 : L'hémostase primaire. D'après (12)

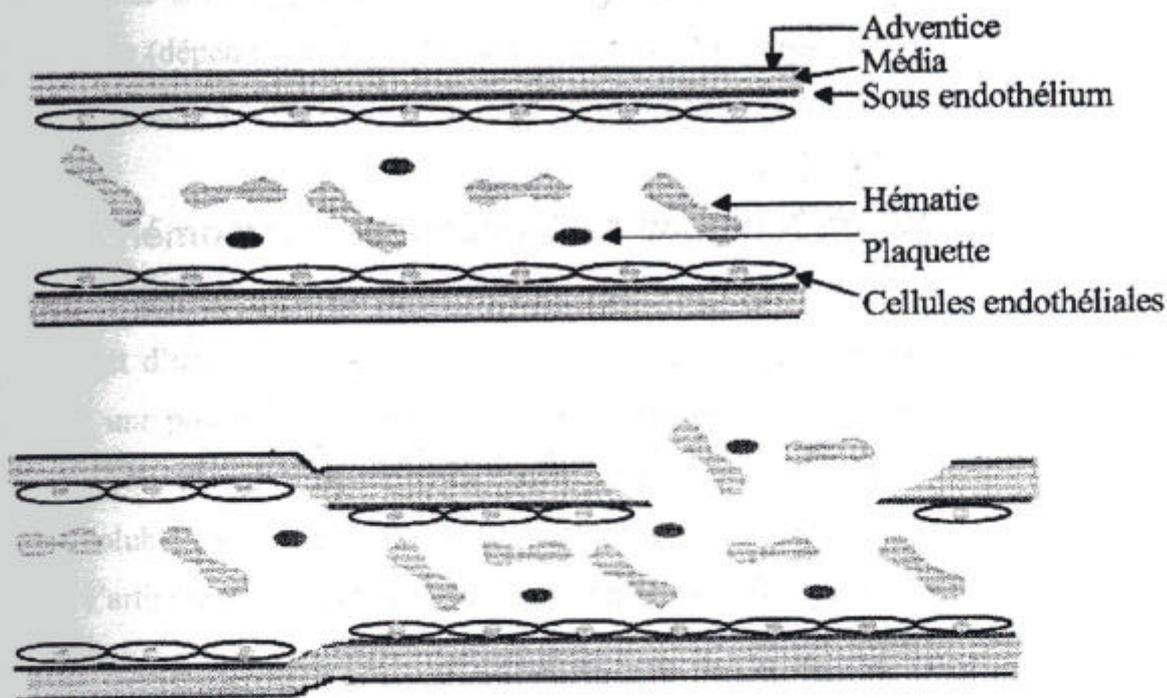


Fig. 1. a) Temps vasculaire

On observe en haut les structures d'un vaisseau sanguin normal, avec l'endothélium, le sous-endothélium, la média et l'adventice. En dessous est schématisée la vasoconstriction qui fait suite à l'ouverture de la brèche vasculaire.

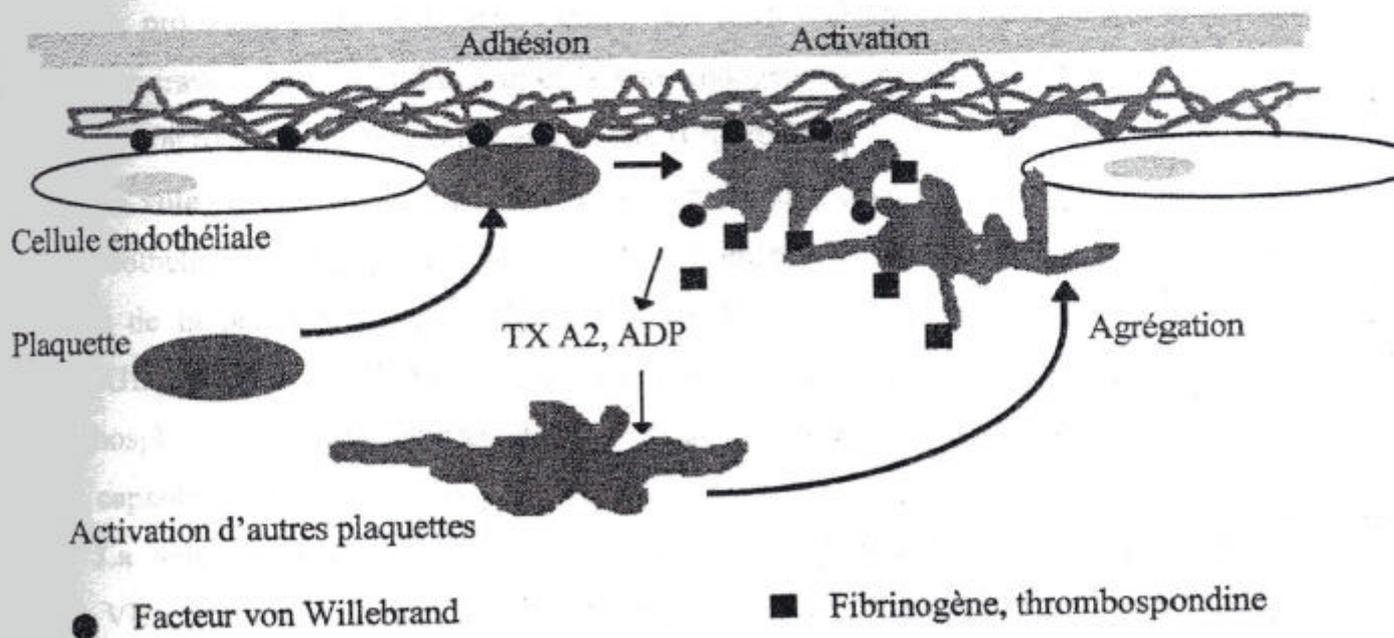


Fig. 1. b) Temps plaquettaire

La mise à nu du sous-endothélium entraîne l'adhésion des plaquettes par l'intermédiaire du collagène et du facteur Von Willebrand. Cette adhésion entraîne l'activation des plaquettes qui changent de forme, exposent de nouveaux récepteurs au fibrinogène et libèrent des médiateurs comme l'ADP ou le TX A2 qui activent d'autres plaquettes et les attirent vers le site lésé. Les plaquettes ainsi activées peuvent alors se lier très fortement entre elles et former des agrégats stables : c'est l'agrégation plaquettaire.

- L'agrégation plaquettaire :

Il s'agit de la formation d'agrégats stables de plaquettes. L'agrégation se divise en une phase réversible (dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et des ponts de fibrinogène) et une phase irréversible (créée par les protéines adhésives : thrombospondine, fibronectine...).

## I.2. L'hémostase secondaire : la coagulation plasmatique

Il s'agit d'une cascade enzymatique où des protéines plasmatiques (les facteurs de coagulation), une protéine tissulaire (le Facteur Tissulaire), du calcium et des phospholipides interviennent pour aboutir à la formation de thrombine, une enzyme capable de transformer le fibrinogène soluble en polymère de fibrine insoluble (12, 28, 46).

Elle s'articule en deux étapes : la formation de thrombine puis la fibrinoformation.

### I.2.1. La formation de thrombine

La thrombine (IIa) est le fruit du clivage de la prothrombine (II) par le *complexe prothrombinase*, composée du Xa, Va, de  $\text{Ca}^{2+}$  et de phospholipides plaquettaires chargés négativement.

La prothrombinase peut être formée par deux mécanismes coexistants : la voie exogène (extravasculaire ou tissulaire) et la voie endogène (intravasculaire) qui diffèrent par leur mode d'activation et les facteurs mis en jeu. (Figure 2)

**La voie endogène** est initiée par le contact du sang avec une surface électronégative (sous-endothélium ou paroi du tube *in vitro*) qui entraîne l'activation du système contact composé de la prékallicréine, du Kininogène de Haut poids Moléculaire (KHPM) et du facteur XII. Les facteurs XII, XI et IX sont successivement activés. Le facteur IX se lie alors à des phospholipides membranaires, de  $\text{Ca}^{2+}$  et au cofacteur VIIIa pour former le *complexe ténase*, capable d'activer le facteur X en Xa.

**La voie exogène** aboutit aussi à l'activation du facteur X par le facteur VIIa. Le facteur VII est activé par sa liaison à une protéine tissulaire exprimée par la plupart des cellules de l'organisme, sauf les cellules endothéliales. Cette protéine tissulaire est appelée Facteur tissulaire (FT) et est exprimée en grande quantité par les cellules périvasculaires.

### I.2.2. *La formation de fibrine*

Une fois la thrombine formée, celle-ci clive le fibrinogène en monomères de fibrine solubles. Ensuite, ces monomères se polymérisent puis sont stabilisés par le facteur XIIIa activé par la thrombine: en présence de  $Ca^{++}$ , des liaisons covalentes se forment entre les polymères aboutissant au caillot de fibrine insoluble (28). ( Figure 2)

L'ensemble des réactions aboutissant à la formation de fibrine à partir du complexe prothrombinase porte le nom de **voie commune**.

### I.2.3. *Coagulation in vivo et boucles de rétroactivation*

Le schéma de coagulation que nous venons de décrire est tout à fait exact *in vitro* mais se trouve être légèrement différent *in vivo* où le facteur VIIa couplé au Facteur Tissulaire est le principal activateur du facteur IX (et non le facteur XI et le système contact) (2). Ceci montre notamment que les deux voies de la coagulation agissent en synergie dans le processus d'hémostase (46).

D'autre part, la coagulation plasmatique *in vivo* est un phénomène auto-entretenu. Ceci s'explique par l'existence de nombreuses boucles de rétroactivation :

- **La thrombine** joue un rôle clé dans l'hémostase puisque même une quantité infime de cette enzyme permet une amplification massive de la cascade de coagulation en activant le facteur VII, le facteur IX et les cofacteurs V et VIII.

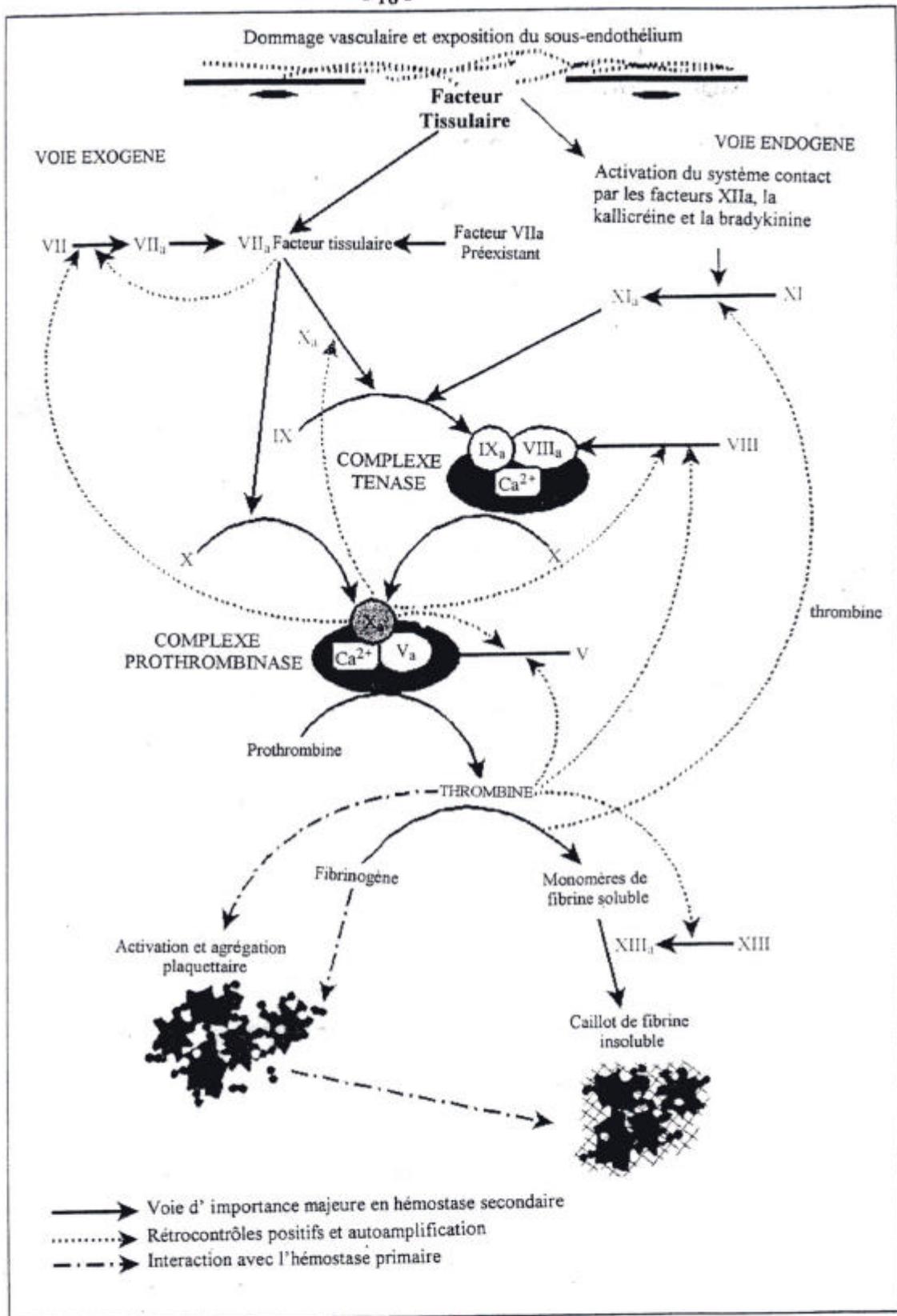
- **Le facteur Xa** est capable d'activer le V en Va, le VIII en VIIIa et d'accélérer la formation du VII quand il est lié au Facteur Tissulaire.

### I.2.4. *Régulation de la coagulation*

Ces mécanismes d'autoamplification impliquent l'existence d'inhibiteurs puissants afin de contrôler le processus et d'éviter l'entrée dans un état d'hypercoagulabilité.

**L'antithrombine III (AT III)** est une  $\alpha_2$  globuline qui assure la plus importante activité inhibitrice sur la thrombine. Elle est potentialisée par l'héparine et les héparanes sulfates situés à la surface des cellules et inhibe aussi les facteurs IXa, Xa et XIa. (18)

**Le Tissue Factor-Pathway Inhibitor (TFPI)** est une protéine exprimée par les cellules endothéliales qui inhibe le facteur VIIa lié au facteur tissulaire et le facteur Xa. (12)



**Figure 2 : L'hémostase secondaire. D'après (28)**

La mise à nu du sous-endothélium entraîne l'exposition du facteur tissulaire qui se fixe à la petite quantité préexistante de facteur VII activé, pour former le complexe FT-VIIa qui active directement le facteur X en Xa. Le processus est amplifié par le Xa qui exerce un rétrocontrôle positif sur le facteur VII. Le complexe FT-VIIa active également le facteur IX en IXa qui lui même active le X via le complexe ténase qu'il forme avec le VIIIa, le Ca<sup>2+</sup> et les phospholipides membranaires. Le facteur VIII est activé en VIIIa par le facteur Xa et la thrombine par un feedback positif. Le complexe prothrombinase est formé par le Xa, le Va (activé par la thrombine et le Xa), le Ca<sup>2+</sup> et des phospholipides et permet de convertir la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa). La thrombine permet l'autoamplification de la coagulation par ses rétrocontrôles positifs sur les facteurs V, VIII et XIII. D'autre part, la thrombine est un agoniste plaquettaire qui assure la continuité de l'hémostase primaire et donc du clou plaquettaire durant tout le processus d'hémostase. La thrombine convertit le fibrinogène en monomères de fibrine et active le XIII qui permet la formation de polymères de fibrine insoluble.

**La protéine C et la protéine S** sont des protéines anticoagulantes vitamine K dépendantes qui sont activées par le complexe formé de la thrombomoduline (une glycoprotéine membranaire des cellules endothéliales) et la thrombine qui se trouve alors inactivée. Elles inhibent de façon puissante les facteurs Va et VIIIa et donc les complexes ténase et prothrombinase (28).

### **I.3. La fibrinolyse**

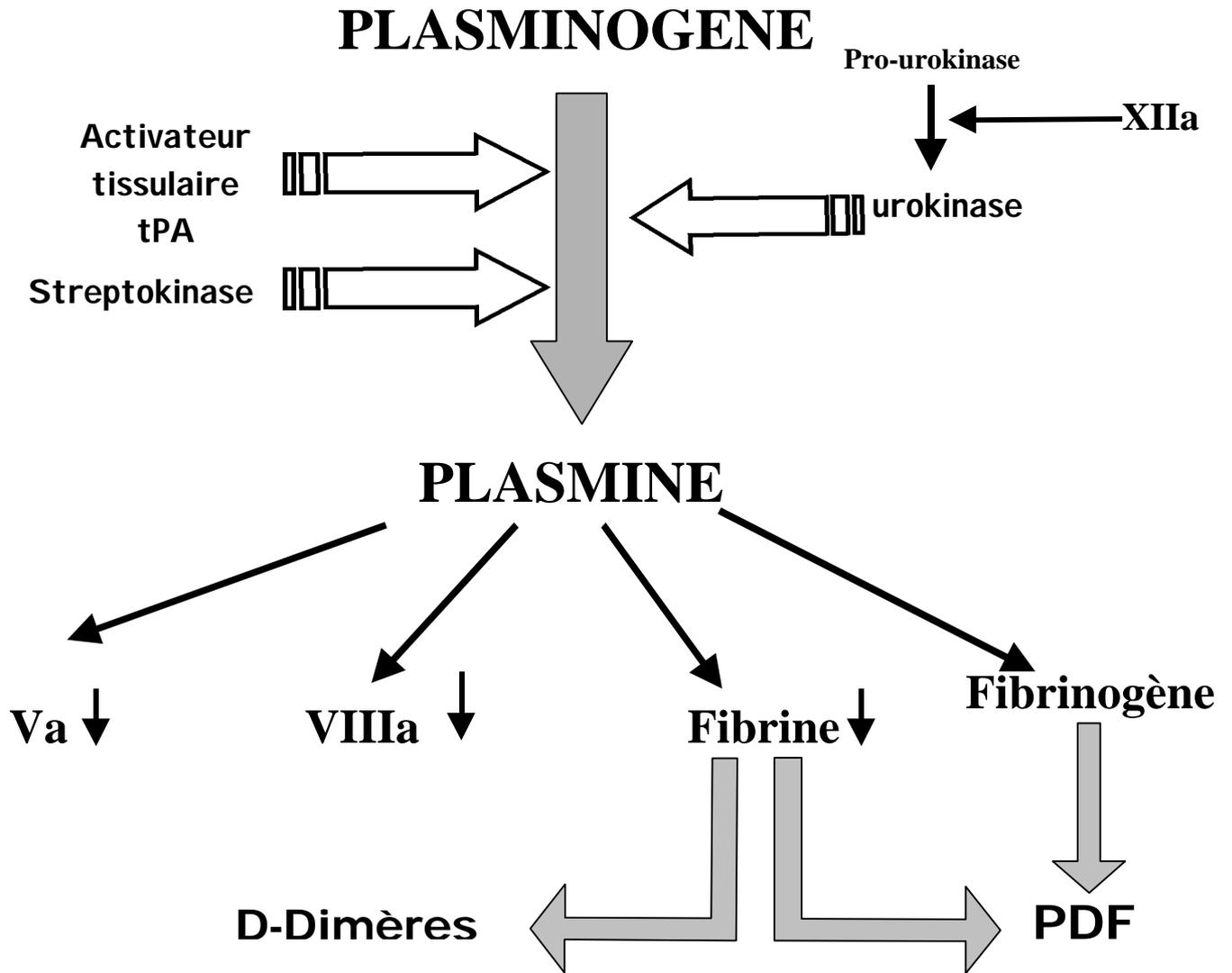
C'est l'étape finale de réparation du dommage vasculaire qui rétablit la perméabilité vasculaire en lysant le caillot de fibrine. L'enzyme clé de cette phase est la plasmine, dont le précurseur est le plasminogène, synthétisé par le foie (34). Le déclenchement de la fibrinolyse passe donc par l'activation du plasminogène en plasmine. Une fois activée, la plasmine exerce son activité protéolytique et dégrade la fibrine insoluble et le fibrinogène en divers produits de dégradation, notamment les Produits de Dégradation de la Fibrine et du fibrinogène (PDF) et les D-Dimères (voir Partie I § I.3.4).

#### *I.3.1. Activation du plasminogène (Figure 3) (10, 12)*

- L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) :

C'est lui qui joue le rôle principal dans l'activation. Les cellules endothéliales produisent et relarguent du tPA en réponse à divers stimuli dont certaines molécules de l'inflammation (bradykinine, histamine), de l'hémostase (thrombine, facteur X) ou les catécholamines. C'est ainsi qu'il peut être libéré lors d'interventions chirurgicales, de stress, d'anoxie ou d'exercice physique violent.

Le tPa se lie tout d'abord à la fibrine, ce qui permet une focalisation du tPA au site du thrombus. Ce n'est qu'à ce moment là que le tPA peut se lier au plasminogène et l'activer en plasmine.



**Figure 3 : Schéma de l'activation de la fibrinolyse.**

Le plasminogène, présent dans le sang circulant et sur les cellules endothéliales est activé en plasmine par le tPA, le système urokinase ou encore par des molécules thrombolytiques comme la streptokinase. La plasmine entraîne la dégradation de la fibrine et du fibrinogène, mais exerce également une activité anticoagulante en inhibant les facteurs Va et VIIIa.

- Le système pro-urokinase – urokinase :

La pro-urokinase est une protéine initialement découverte dans les urines, présentant une forte affinité pour le plasminogène. Elle est activée en urokinase par la kallibréine, le KHPM, le facteur XIIa et la plasmine.

- Autres activateurs :

Le facteur XIIa et la kallibréine activent aussi le plasminogène directement.

D'autres activateurs non physiologiques ont été obtenus à partir de cultures *in vitro* de streptocoques hémolytiques (streptokinase) ou par génie génétique (tPA recombinant) : ils sont utilisés en médecine humaine en tant qu'agents fibrinolytiques pour reperméabiliser les vaisseaux lors d'infarctus.

### I.3.2. *Contrôle de la fibrinolyse*

La fibrinolyse est contrôlée par des inhibiteurs plasmatiques spécifiques qui inactivent les activateurs du plasminogène et la plasmine. La plasmine est inhibée par l' $\alpha_2$  antiplasmine et l' $\alpha_2$  macroglobuline. L'Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène – 1 (PAI-1), sécrété par les cellules endothéliales, les hépatocytes et les plaquettes, est l'inhibiteur le plus important du tPA et de l'urokinase. Presque tout le tPA circulant est lié au PAI-1 mais seul le tPA lié à la fibrine peut activer la plasmine (12).

### I.3.3. *Effets de la plasmine : formation des PDF et des D-dimères (Figure 4)*

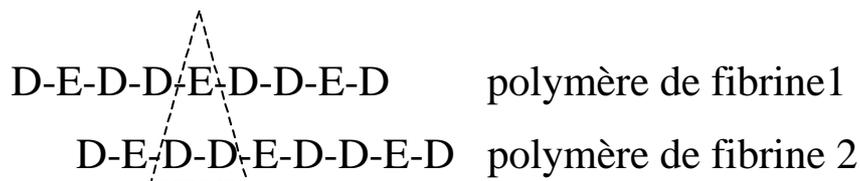
La plasmine a une action protéolytique sur les facteurs V et VIII. Cependant, dans les conditions physiologiques, comme la plasmine n'existe pas à l'état libre dans le plasma, sauf lors de traitement thrombolytique (streptokinase) ou lors de rares cas de CIVD, l'importance physiologique de ce phénomène est négligeable (3, 12, 34).

La principale action protéolytique de la plasmine concerne le fibrinogène et la fibrine. Les produits de dégradation de ces deux molécules sont regroupés sous le terme de PDF. Ainsi les tests de dosages des PDF classiques ne permettent pas de distinguer les produits de dégradation issus de la fibrine de ceux issus du fibrinogène.

- Action sur le fibrinogène : Le fibrinogène est constitué de trois paires de chaînes polypeptidiques : les chaînes A- $\alpha$ , B- $\beta$  et  $\gamma$ . Ces chaînes forment en trois endroits des

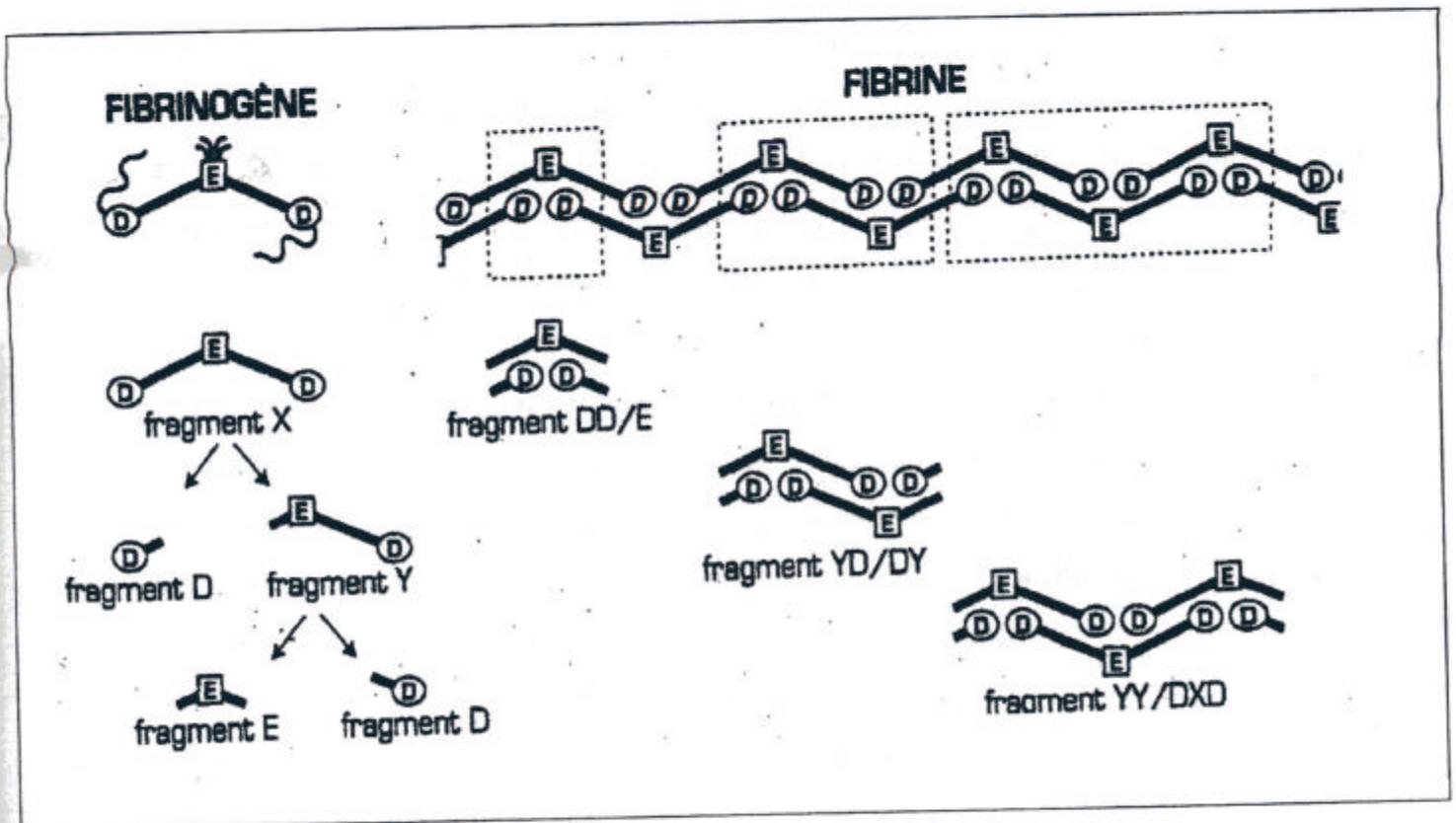
nodules : un nodule D est situé près de chacune des extrémités de la molécule et un nodule E est central. Entre les nodules, les chaînes sont linéaires. Quand elle agit sur le fibrinogène, la plasmine s'attaque d'abord à un petit peptide de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de la chaîne B-β. Ensuite, la protéolyse du fibrinogène donne successivement les fragments X, Y, D et E (Figure 4). Le fragment X possède un effet inhibiteur sur l'agrégation plaquettaire, le Y inactive la thrombine et les fragments X, Y et D peuvent se lier aux monomères de fibrine pour empêcher leur polymérisation. Une augmentation des produits de dégradation du fibrinogène a donc un effet globalement anticoagulant (3).

- Action sur la fibrine : Le monomère de fibrine possède sur son nodule E central des sites capables de se lier aux nodules D situés aux deux extrémités des monomères de fibrine voisins. On a ainsi un décalage des chaînes de monomères placées côte à côte et de ce fait l'apparition d'une organisation trinodulaire typique ( D-D + E ) formée par des polymères voisins, comme ceci (voir Figure 4 pour les schémas) :



Du fait de cette structure particulière, la protéolyse de la fibrine engendre des fragments plus complexes (X-oligomères) dont le point commun est de posséder des fragments D-D, inexistant dans les produits de dégradation du fibrinogène. Des anticorps monoclonaux spécifiques capables de reconnaître les fragments D-D permettent de doser les D-Dimères dans le plasma (3).

Après avoir fait ces quelques rappels de physiologie et expliqué le mécanisme de formation des D-Dimères, il convient de présenter l'affection dans laquelle ce test des D-Dimères trouve son intérêt diagnostique en médecine vétérinaire: la Coagulation IntraVasculaire Disséminée (CIVD).



**Figure 4 : Effets de la plasmine sur la molécule de fibrinogène et la fibrine.  
D'après BONEU**

Le fibrinogène est représenté avec ses domaines E central et D périphériques. Dans un premier temps, la plasmine coupe l'extrémité COOH du domaine D, pour donner le fragment X. Ensuite, la plasmine clive le fragment X en fragments Y, D et enfin E qui correspond à la molécule la plus compacte. L'effet de la plasmine sur la fibrine génère des fragments plus complexes en raison des liaisons covalents créées par le facteur XIIIa entre deux domaines D. les fragments libérés contiennent tous la structure D-D d'où le nom de D-Dimères attribué aux produits de dégradation de la fibrine.

## II. LA CIVD ET SON DIAGNOSTIC

Comme nous l'avons vu, l'activation de la coagulation et la formation de thrombine constituent une réponse normale à toute lésion vasculaire. Le phénomène de CIVD est un **état d'hypercoagulabilité** où la formation de thrombine n'est plus contrôlée et s'étend à la circulation générale, soit parce que les facteurs déclenchant la coagulation sont présents en excès, soit parce que les mécanismes de contrôle sont dépassés. Elle se caractérise par la formation de multiples thrombi dans la microcirculation, qui peuvent être à l'origine de dommages organiques secondaires par hypoxie. Il s'agit avant tout d'une **complication fréquente et peu spécifique d'un grand nombre de processus pathologiques**. Elle peut être aiguë ou chronique et se manifester cliniquement de façon variable soit par une absence de symptômes soit par des signes hémorragiques ou thrombotiques sévères. En effet, la CIVD est une affection paradoxale où un état d'hypercoagulabilité **se traduit souvent par des tendances hémorragiques** suite à la consommation des facteurs de coagulation et des plaquettes. D'autre part, en réponse aux nombreux caillots formés, le système fibrinolytique entre en action avec une **fibrinolyse secondaire** à l'origine de produits de dégradation de la fibrine, aux propriétés anticoagulantes. (17)

### II.1. Etiopathogénie et symptômes de la CIVD (17, 23, 41)

#### II.1.1. Etiopathogénie (figure 5)

La pathogénie de la CIVD est étroitement liée à l'association de facteurs favorisants et de facteurs déclenchants. Ces derniers initient la coagulation tandis que les premiers favorisent l'apparition d'un terrain déficient en facteurs régulateurs de la coagulation. (17)

- Facteurs favorisants :

- **La stase sanguine** empêche l'effet de dilution et l'élimination des facteurs activés, favorisant ainsi le développement de la cascade de coagulation.
- **Le blocage du système réticulo-endothélial (SRE)** augmente la durée de vie des facteurs activés, des PDF et des facteurs tissulaires. La saturation du SRE nuit à la phagocytose et

à l'élimination des microthrombi. Cette situation se rencontre lors d'atteinte hépatique grave, d'endotoxémie, d'immunosuppression, d'hémolyse extravasculaire ou de splénectomie.

- **Le déficit en AT III**, inhibiteur principal de la coagulation se rencontre lors de syndrome néphrotique, d'atteinte hépatique grave, de déficience héréditaire ou lors d'administration prolongée d'héparine.
- **L'acidose** inhibe l'héparine et l'ATIII et augmente la libération de tPA, prédisposant ainsi à la CIVD.
- **L'état de choc** favorise la stase sanguine et s'accompagne généralement d'acidose et d'hypoxie tissulaire. La CIVD en est donc une complication assez fréquente.

Il faut souligner que ces facteurs favorisants peuvent aussi être la conséquence de la CIVD et devenir ainsi des facteurs d'auto-aggravation de cette affection.

- Facteurs déclenchants :

- **Les lésions de l'endothélium vasculaire** provoquent l'exposition du collagène sous-endothélial qui active le facteur XII et par suite toute la voie endogène. De plus, les cellules endothéliales activées produisent du facteur tissulaire. On rencontre ces lésions endothéliales responsables de CIVD lors de coup de chaleur, hyperthermie paranéoplasique, maladies virales, parasitisme cardiovasculaire, choc endotoxinique ou dépôt d'immuns complexes.
- **La libération de facteur tissulaire** fait suite à une nécrose tissulaire importante [brûlures, néoplasmes disséminés, polytraumatismes, chirurgies lourdes, pancréatites, avortements, défibrination obstétricale (fréquentes en médecine humaine)] et active, après liaison au facteur VII, la voie extrinsèque de la coagulation. Il semblerait que ce facteur soit mis en cause dans la majorité des cas de CIVD. (41)
- **Les enzymes protéolytiques** libérées lors d'envenimations ophidiennes (« thrombin-like ») ou de pancréatites (trypsine) activent directement le facteur X.
- **La libération massive de phospholipides membranaires** lors de destruction de plaquettes, érythrocytes ou leucocytes permet de fournir les phospholipides nécessaires aux deux voies de la coagulation. Ceci se produit lors de transfusions incompatibles, d'anémies hémolytiques d'origine parasitaire, immunitaire ou médicamenteuse dans lesquelles on assiste en outre à un relargage simultané de facteur tissulaire érythrocytaire.

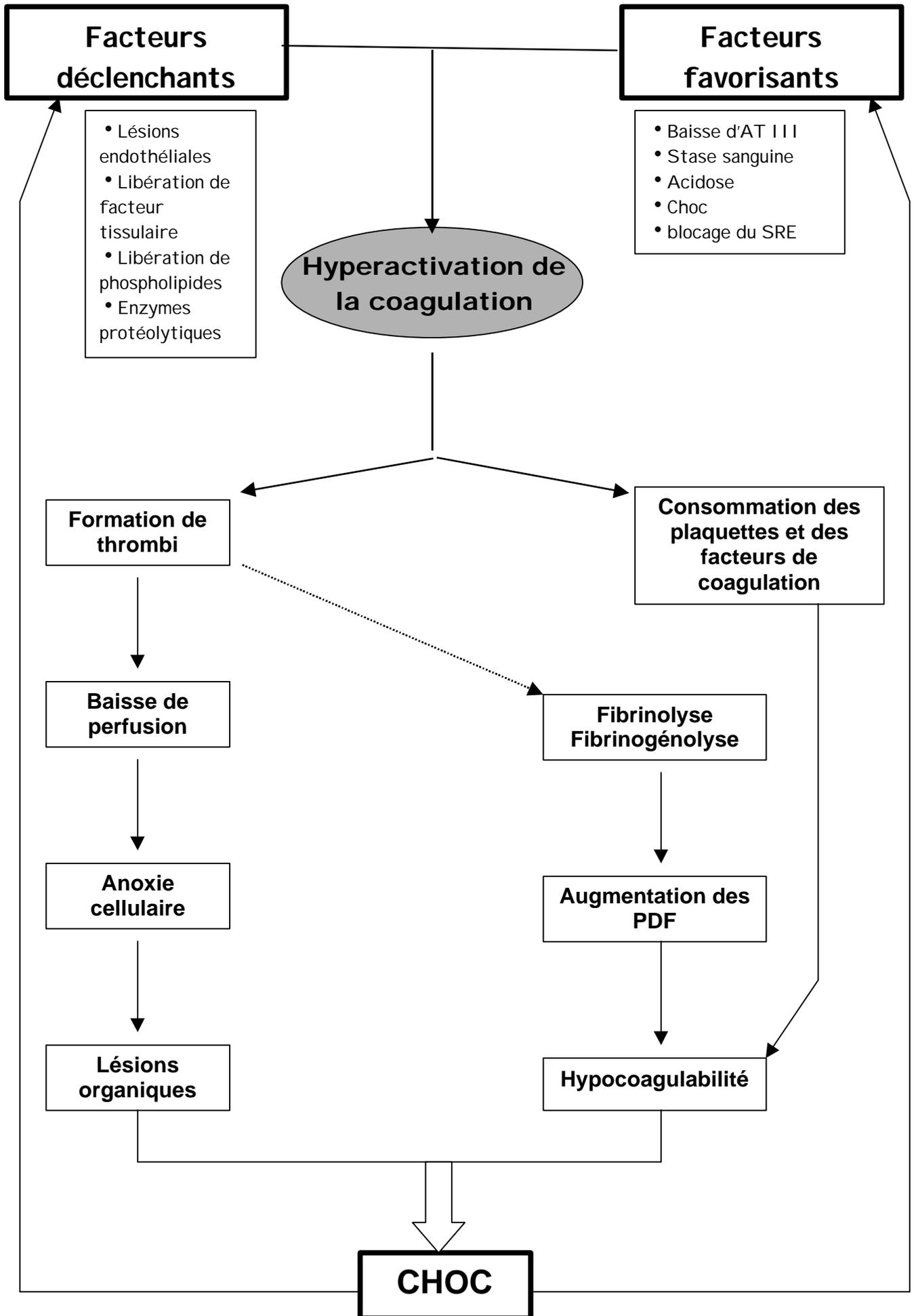


Figure 5 : Etiopathogénie de la CIVD. D'après (17).

La CIVD est associée à un grand nombre d'entités cliniques. Le tableau 1 résume les affections associées le plus fréquemment à une CIVD.

Une CIVD peut être suspectée chez des patients souffrant d'une crise hypotensive, d'une hypoperfusion au niveau d'un organe majeur ou d'un relargage de substances vasoactives dans la circulation générale. De plus, elle doit être anticipée dans les maladies causant une importante réponse inflammatoire systémique (coup de chaleur, tumeur splénique, anémie hémolytique à médiation immune, dirofilariose chronique...) ou une hypotension sévère et prolongée. (16)

### II.1.2. *Symptômes*

Il est très important de garder à l'esprit que selon l'étendue, la sévérité et la rapidité d'apparition de l'affection causale, la CIVD peut se présenter sous une grande variété de tableaux cliniques allant du stade suraigu fulminant au stade chronique quasi asymptomatique. (16,17, 25)

Dans les **formes suraiguës**, l'état de choc prédomine mais les patients peuvent ne pas présenter de signes cliniques manifestes. Ce sont alors les tests de laboratoire qui permettent le diagnostic précoce (voir Partie I § II.2.2.). La CIVD est alors souvent un signe avant coureur de la mort. Le pronostic est très sombre.

Dans les **formes aiguës** (les plus fréquentes) on retrouve l'association d'un syndrome hémorragique et de défaillances organiques liées à la nécrose ischémique causée par les microthrombi.

- les symptômes hémorragiques, le plus souvent symptômes d'appel des CIVD sont variables : la thrombopénie résultant de la consommation des plaquettes est responsable de pétéchies, ecchymoses, purpura au niveau muqueux et cutané (abdomen, creux axillaire et inguinal, face interne des oreilles), tandis que la consommation des facteurs entraîne des troubles de la coagulation (hémorragies cavitaires, synoviales, hématomes, hématurie, hémoptysie, hématomèse, méléna, métorrhagies).
- Des lésions de nécrose ischémique peuvent atteindre différents organes :
  - le foie : l'insuffisance hépatique aiguë est rapportée comme assez commune. (16)

<b>NEOPLASMES</b>
<i>Carcinome thyroïdien</i> <i>Carcinome mammaire</i> <i>Hémangiosarcome</i> <i>Lymphome</i> <i>Maladie myéloproliférative</i>
<b>MALADIES INFLAMMATOIRES</b>
<i>Pancréatite</i> <i>Hépatite chronique active</i> <i>Gastroentérite hémorragique</i> <i>Pyomètre</i> <i>Pyodermite généralisée</i> <i>Broncho-pneumonie suppurée</i>
<b>MALADIES A MEDIATION IMMUNE</b>
<i>Anémie hémolytique à médiation immune</i> <i>Glomérulonéphrite</i> <i>Lupus érythémateux disséminé</i>
<b>MALADIES INFECTIEUSES</b>
<i>Sepsis bactérien</i> <i>Hépatite de Rubarth</i> <i>Leptospirose</i> <i>Parvovirose</i> <i>Péritonite Infectieuse Féline</i>
<b>MALADIES PARASITAIRES</b>
<i>Babésiose</i> <i>Dirofilariose</i> <i>Angiostrongylose</i> <i>Ehrlichiose</i> <i>Rocky Mountain spotted fever</i>
<b>DELABREMENT TISSULAIRE MAJEUR</b>
<i>Brûlures</i> <i>Trauma</i> <i>Chirurgie lourde notamment obstétricale</i> <i>Coup de chaleur</i>
<b>DIVERS</b>
<i>Envenimation ophidienne</i> <i>Choc hypovolémique</i> <i>Syndrome dilatation – torsion de l'estomac</i> <i>Insuffisance cardiaque congestive</i> <i>Transfusion incompatible</i> <i>Aflatoxicose</i> <i>Complication obstétricale</i>

**Tableau 1 : causes de CIVD chez le chien et le chat. D'après (9, 17, 20, 26, 30, 32, 42)**

- les poumons peuvent être touchés avec des signes de dyspnée, cyanose et syndrome de détresse respiratoire aiguë.
- les reins, avec une insuffisance rénale aiguë oligoanurique accompagnée d'une protéinurie.
- les surrénales, avec une insuffisance surrénalienne aiguë renforçant l'état de choc.
- le système nerveux central avec convulsions, paraplégie, perte de conscience ou coma.
- le tube digestif qui lorsqu'il est touché par des thrombi peut subir une nécrose et une ulcération de la muqueuse.
- la peau, avec des lésions gangréneuses surtout localisées aux extrémités et à la queue. (40)

- Associée à ces composantes thrombotiques et hémorragiques, un **état de choc** hypotensif est reporté dans la quasi-totalité des cas de CIVD aiguës. Il s'explique par les pertes de sang et les thromboses dans les circulations pulmonaires et hépatiques qui conduisent à une chute du débit cardiaque. (32)

Dans les **formes chroniques**, les signes cliniques sont souvent minimes (hémorragies intermittentes...) en raison de l'augmentation compensatrice de la production de plaquettes et de facteurs de coagulation. On parle alors de CIVD compensée par opposition à la CIVD décompensée ou aiguë. On retrouve cette forme dans des maladies où une faible quantité de facteurs procoagulants sont produits sur une longue période, comme par exemple la dirofilariose. Ceci permet à l'organisme d'avoir des périodes plus longues pour rétablir un stock de plaquettes et de facteurs suffisant. Ces CIVD chroniques peuvent passer de l'état compensé à l'état décompensé lors de stress, de maladie intercurrente ou d'aggravation de l'affection primitive. (23, 25)

Il est important pour le clinicien de noter que la plupart du temps les hémorragies ne sont qu'une manifestation tardive d'un phénomène de CIVD et que les défaillances organiques sont en général les premières à apparaître, le plus souvent sous une forme peu spécifique ou sous la forme d'un état de choc. Le polymorphisme de cette affection impose donc au clinicien de penser à une CIVD dans un grand nombre de situations, afin de mettre en place les examens de laboratoires appropriés pour confirmer sa suspicion.

## II.2. Diagnostic de la CIVD

### II.2.1. *Suspicion clinique*

Une suspicion de CIVD doit être faite quand :

- des signes cliniques dénotant des saignements anormaux sont présents : pétéchies, ecchymoses, dyspnée, distension abdominale.
- des signes de défaillance multiorganique apparaissent suite à une affection initiale prédisposant à une CIVD, comme une dilatation-torsion d'estomac, une pancréatite, une septicémie ou un coup de chaleur.
- une affection initiale prédisposant à une CIVD est présente avec des examens de laboratoire montrant un trouble de l'hémostase comme une thrombopénie ou des temps de coagulation allongés.

### II.2.2. *Diagnostic de laboratoire (16)*

Actuellement, que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, aucun test isolé ne permet de diagnostiquer une CIVD avec certitude. Le diagnostic repose donc sur un ensemble de tests ou de signes biologiques. Le diagnostic précoce de cette affection est souvent vital car le traitement donne de meilleurs résultats s'il est commencé dans les premiers stades.

Le comptage des plaquettes sur frottis (Valeurs usuelles (VU) : 10 à 13 par champ à l'huile à immersion), le temps de saignement gingival (VU : 1 à 5 minutes) et le temps de recalcification (Activated Clotting Time (ACT) ; VU : inférieure à 120 sec chez le chien et 90 sec chez le chat) sont des tests rapides et de routine d'exploration de l'hémostase primaire et secondaire qui permettent d'orienter le clinicien vers une CIVD. Cependant, ces tests, s'il s'avèrent négatifs, ne permettent pas d'exclure une CIVD.

Ensuite, d'autres tests et signes biologiques permettent de confirmer ou d'infirmier la suspicion diagnostique :

- Thrombopénie :

Une thrombopénie modérée à sévère (inférieure à 100 000 plaquettes/ml) est présente dans 80% des cas (14). Cependant, des états inflammatoires systémiques, comme on peut les rencontrer dans de nombreuses causes de CIVD, peuvent induire une thrombocytose réactionnelle qui peut fausser les résultats. C'est pourquoi des animaux présentant une inflammation systémique sévère avec des comptages plaquettaires dans les valeurs normales-basses devraient subir d'autres tests afin d'explorer une éventuelle CIVD, surtout si des macroplaquettes sont visibles au frottis, signe d'un turn-over important.

- Schizocytes :

Les schizocytes sont des globules rouges fragmentés résultant du dommage exercé sur les érythrocytes par les plages de fibrine déposées dans les vaisseaux. Ces cellules sont plus souvent mises en évidence dans les CIVD compensées. Lors de CIVD suraiguës, le phénomène est trop rapide pour entraîner des dommages cellulaires. Le diagnostic différentiel est à faire avec les anémies à corps de Heinz, les déficits en fer et les artefacts liés à la manipulation du prélèvement.

- Temps de Quick (TQ ; Temps de prothrombine) :

Ce test explore la voie extrinsèque et la voie commune de la coagulation (facteurs XIII, VII, X, V, II et I). Il est allongé quand un des facteurs évalués par ce test a une activité inférieure à 30 % de sa valeur normale. Lors de CIVD, la consommation du fibrinogène par biotransformation, l'inhibition du facteur V par la plasmine et l'interférence dans la polymérisation de la fibrine par les PDF entraîne l'allongement de ce temps. En revanche, dans les stades précoces souvent inaperçus de CIVD, le TQ peut être plus court que le témoin, en raison de l'état transitoire initial d'hypercoagulabilité. Dans l'étude de FURIC (18), portant sur 20 chiens, il est allongé dans 80 % des cas.

- Temps de Céphaline Activé (TCA) et temps de recalcification (ACT) :

Ce test explore la voie extrinsèque et la voie commune de la coagulation (facteurs XIII, XII, XI, IX, VIII, X, V, II et I). Il est allongé ou raccourci pour les mêmes raisons que le

Temps de Quick (vide supra). Dans une série de 47 cas de CIVD, le TCA s'est révélé allongé dans 87 % des cas (14). Une prolongation de l'ACT s'observe lors de trouble sévère de la coagulation. Il est moins sensible que le TCA et par conséquent un test négatif ne permet pas d'exclure une CIVD : il doit être complété par un TCA mais reste très utile en pratique courante ou en urgence (39).

- Temps de Thrombine :

Il explore une partie de la voie commune (I et XIII) et est allongé lors d'hypofibrinogénémie ou de présence d'inhibiteurs de la thrombine (héparine, PDF). On le retrouve moins souvent allongé lors de CIVD que les autres temps : de 55 à 75 % des cas selon les études rétrospectives (14, 18). Lors d'héparinothérapie, le temps de Thrombine sera toujours allongé ; il est donc possible d'utiliser le temps de reptilase, une enzyme du venin de serpent qui remplace la thrombine mais n'est pas sensible à l'héparine.

- Fibrinogénémie :

La CIVD entraîne une consommation du fibrinogène par transformation en fibrine. Cependant, comme le fibrinogène est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation, les états inflammatoires généralisés induisent une hyperfibrinogénémie. Ainsi, des valeurs normales-basses de fibrinogène doivent attirer l'attention du clinicien et suggérer une éventuelle CIVD. De façon paradoxale, la diminution du taux de fibrinogène est assez rare, l'animal présentant souvent un syndrome inflammatoire marqué.

- Dosage des PDF :

Ce dosage est aujourd'hui déterminant en médecine vétérinaire pour le diagnostic d'une CIVD, alors qu'il est délaissé en médecine humaine à cause de l'apparition du test des D-Dimères, plus performant (*vide infra*). Comme nous l'avons vu au § I.3.3., l'apparition de PDF dans le plasma implique la présence de plasmine qui dégrade le fibrinogène et la fibrine, si elle est présente. Les tests semi-quantitatifs utilisés en routine sont basés sur des techniques d'agglutination sur bulles de latex et détectent la présence de fragments D et E par l'intermédiaire d'anticorps de lapin anti-PDF humain.

Le dosage des PDF est intéressant d'un point de vue physiologique et diagnostique. Physiologiquement, une quantité accrue de PDF est associée à une tendance hémorragique (effet anticoagulant des PDF). D'un point de vue diagnostique, une augmentation des PDF se retrouve lors de CIVD mais aussi lors de fibrinolyse primitive (voir Partie I § III. 2.1.), de thromboembolies ou d'insuffisance hépatique (par défaut d'épuration). Les PDF peuvent aussi augmenter lors de la manipulation ou du transport du prélèvement. Ainsi, **les PDF ne sont pas pathognomoniques d'une CIVD** et on peut retrouver des valeurs de PDF élevées alors qu'aucun caillot n'est présent. En revanche, il a été montré expérimentalement que des hémorragies internes relativement importantes ou des hématomes ne causaient pas d'augmentation des PDF circulants (27).

Aussi, des PDF négatifs ne permettent pas d'exclure cette affection : la libération excessive de protéases (élastase et collagénase) dégradant les PDF, la manipulation des échantillons, des taux très bas de fibrinogène peuvent entraîner des faux négatifs. De même, l'apparition des PDF peut être retardée et amener des résultats négatifs, tout comme dans certaines CIVD chroniques.

Des valeurs supérieures à 10 µg/ml dénotent chez le chien une augmentation de l'activité fibrinolytique et des valeurs supérieures à 40 µg/ml sont souvent observées lors de CIVD mais ne préjugent en aucun cas de la gravité de la maladie. (41)

Ainsi, le dosage des PDF apparaît très utile dans le diagnostic des CIVD mais il ne doit pas être demandé de manière isolée et doit être replacé dans un contexte clinique et biologique.

- Dosage des D-Dimères :

Les D-dimères sont les produits de dégradation de la [seule] fibrine et impliquent directement une activité fibrinolytique secondaire à la coagulation. En effet, les D-Dimères sont plus spécifiques de la fibrinolyse car leur formation nécessite l'action du facteur XIIIa, formé par l'action de la thrombine pour produire de la fibrine insoluble et le clivage de cette fibrine par la plasmine. Par opposition aux dosages de PDF classiques, ils permettent de faire le distinguo entre l'action de la plasmine sur le fibrinogène (fibrinogénolyse) et sur la fibrine (fibrinolyse). Des tests semi-quantitatifs et quantitatifs des D-Dimères ont été validés mais ne sont pas encore utilisés en routine en médecine vétérinaire. Le but de notre étude est de

valider un nouveau test quantitatif de dosage des D-Dimères. L'intérêt du dosage des D-Dimères en médecine vétérinaire et en médecine humaine sera discuté au § III.2. .

- Antithrombine III :

Cet inhibiteur de la coagulation est consommé lors de CIVD. Des patients en état d'hypercoagulabilité ont des activités en AT III inférieures à 80 %. Cependant, cette diminution d'activité n'est pas spécifique des CIVD et le différentiel avec les maladies entraînant une perte de protéines (rénales et intestinales) est à faire. Toutefois, une activité réduite en ATIII quelle qu'en soit la cause rend le patient hypercoagulable et le prédispose à une thrombose ou une CIVD. Il est à noter que les niveaux d'ATIII peuvent s'élever lors de processus inflammatoire. Un des principaux intérêts du dosage de l'ATIII est le suivi de l'héparinothérapie car traiter un patient déficient en ATIII avec de l'héparine est inutile voire dangereux. D'autre part, le dosage de l'ATIII présente un intérêt pronostique : ceci a été montré en médecine humaine où des activités inférieures à 60 % chez des patients critiques sont corrélées avec un taux de mortalité de 97% (22).

- Dosage des facteurs de coagulation :

Ils sont utilisés en médecine humaine mais pas en médecine vétérinaire, du moins en pratique courante. La diminution plus importante du facteur V par rapport aux autres facteurs du complexe prothrombique (II, X et VII) est un signe essentiel d'activation de la coagulation. Lors d'insuffisance hépatocellulaire, les taux des facteurs II, X, VII et V sont diminués dans les mêmes proportions. La diminution relative du facteur V évoque donc un processus de consommation par activation de la coagulation. Cependant, si le dosage est précoce dans l'installation de la CIVD, il n'est pas rare de trouver un taux de facteur V supérieur à la normale en raison de l'état d'hypercoagulabilité initial.

- Conclusion :

Pour résumer, le diagnostic définitif de CIVD devrait inclure au moins trois des paramètres suivants (23):

- Thrombopénie modérée à sévère (inférieure à 100 000 plq/L)
- Allongement des temps de coagulation

- Augmentation des PDF ou des D-Dimères
- Réduction d'activité de l' AT III inférieure à 80 % de sa valeur normale.

D'autres éléments peuvent être considérés comme étant en faveur d'une CIVD :

- Hypofibrinogénémié
- Schizocytes sur le frottis sanguin
- Présence histologique de microthrombi de fibrine, essentiellement dans les capillaires et la circulation veineuse.

Il est important de noter que les présentations tant clinique que biologique sont variables d'un patient à l'autre et selon le stade de l'affection.

### II.2.3. *Diagnostic différentiel (17)*

Le diagnostic différentiel inclut les thrombopénies et les troubles de la coagulation. Le laboratoire est essentiel dans la différenciation de ces troubles.

Le tableau 3 rassemble l'ensemble des causes de thrombopénies centrales et périphériques. Il est intéressant de noter que certaines causes de thrombopénies périphériques, comme les endotoxémies, la babésiose ou des infections bactériennes et virales chroniques sont aussi causes ou facteurs favorisant de CIVD.

La mesure des temps de coagulation, associée éventuellement à d'autres tests permet de déterminer l'origine de la coagulopathie. La figure 6 montre la conduite à tenir pour arriver au diagnostic en écartant les principaux diagnostics différentiels.

Après ces rappels sur la physiopathologie et les différents moyens diagnostiques des CIVD, nous allons considérer plus particulièrement sur l'intérêt que représente le test des D-Dimères en médecine humaine et vétérinaire, afin d'expliquer le but de notre étude expérimentale.

THROMBOPENIES CENTRALES	THROMBOPENIES PERIPHERIQUES		
Baisse de production	Séquestration	Consommation excessive	Destruction excessive
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypoplasie mégakaryocytaire à médiation immune</li> <li>• Aplasie médullaire idiopathique</li> <li>• Toxiques (oestrogènes, phénylbutazone, sulfamides)</li> <li>• Myéloptisie</li> <li>• Myélofibrose</li> <li>• Infection virale, bactérienne, rickettsienne chronique</li> <li>• Rétrovirus</li> <li>• Chimio/radiothérapie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Splénomégalie</li> <li>• Torsion de rate</li> <li>• Endotoxémie</li> <li>• Hypothermie</li> <li>• Hypertension portale</li> <li>• Hépatomégalie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CIVD</li> <li>• Saignements prolongés</li> <li>• Microangiopathie</li> <li>• Septicémie, virémie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A médiation immune :               <ul style="list-style-type: none"> <li>- primaire idiopathique</li> <li>- secondaire à une infection bactérienne, virale ou parasitaire (babésiose)</li> <li>- secondaire à une vaccination à agent vivant</li> </ul> </li> <li>• Médicaments (thiazides, héparine)</li> <li>• Syndrome urémique hémolytique</li> <li>• Microangiopathie</li> </ul>

**Tableau 2: Etiologie des thrombopénies chez les carnivores domestiques. D'après 9, 15, 21.**

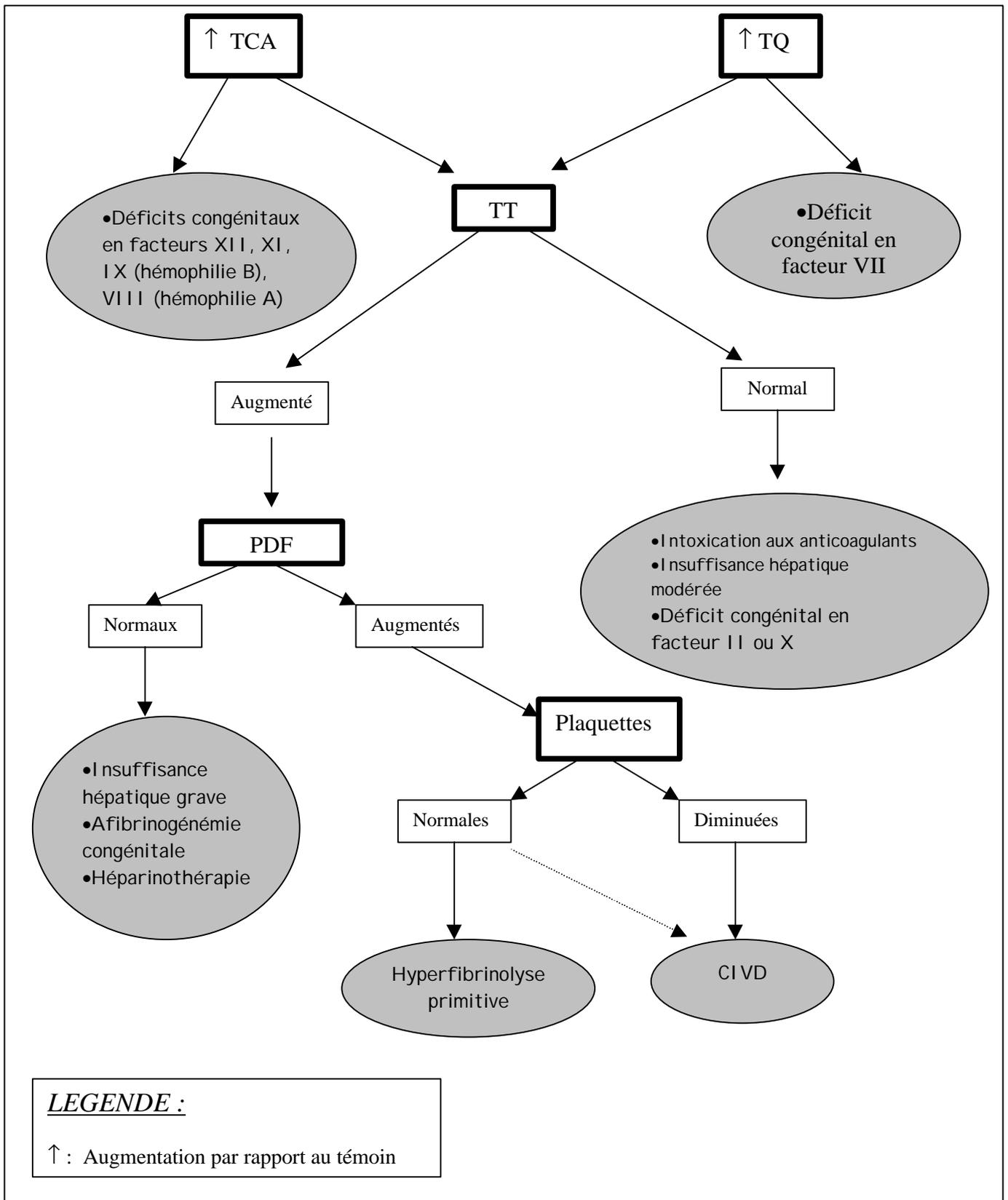


Figure 6 : Diagnostic différentiel lors de troubles de la coagulation. D'après 17.

### **III. LE DOSAGE DES D-DIMÈRES EN HEMOSTASE**

Les D-dimères peuvent être détectés chez l'homme grâce à des tests utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques de l'épitope des D-Dimères humains. Certains de ces anticorps croisent avec certaines espèces animales et peuvent être utilisés en médecine vétérinaire. C'est le cas du chien chez qui différents essais cliniques ont débuté dès 1997 afin de valider ce test pour éventuellement remplacer le dosage des PDF, abandonné en médecine humaine car moins performant.

#### **III.1. Rappels sur la valeur diagnostique d'un test biologique**

La valeur diagnostique d'un test de laboratoire dépend de différents paramètres qui permettent de dire si ce test est fiable. La sensibilité exprime le pourcentage de résultats anormaux trouvés chez des patients atteints par une affection ; la spécificité exprime le pourcentage de faux positifs, c'est-à-dire des résultats anormaux trouvés chez des patients exempts de maladie ; la valeur prédictive positive (reliée à la spécificité) exprime la valeur diagnostique d'un test positif alors que la valeur prédictive négative (reliée à la sensibilité) indique qu'un résultat normal permet d'exclure le diagnostic avec un risque d'erreur de x %, généralement 5%.

#### **III.2. Intérêt du dosage des D-Dimères en tant que marqueur de fibrinolyse**

##### *III.2.1. D-Dimères et diagnostic des CIVD*

Le dosage des D-Dimères présente un certain nombre d'intérêts. Le plus important réside dans le fait que les D-Dimères sont des produits de dégradation de la fibrine seule et non du fibrinogène, comme les PDF. De ce fait, des D-Dimères élevés impliquent la mise en jeu d'une fibrinolyse secondaire à une activation de la coagulation, ce qui est très intéressant

dans le diagnostic des CIVD, alors que les PDF ne peuvent différencier une augmentation liée à une fibrinolyse secondaire d'une augmentation associée à une fibrinogénolyse primitive.

Ces fibrinogénolyses aiguës primitives sont très rares chez l'homme (3) et encore plus chez le chien (13) mais pourraient entraîner des résultats faussement positifs avec le dosage des PDF, par perte de spécificité. Le déclenchement de ces hyperfibrinolyse est lié à des hyperplasminémies, soit par un excès d'activateurs du plasminogène, soit par un défaut d'inhibiteurs de la plasmine. Elles peuvent survenir lors de coup de chaleur, d'hémopathies malignes, de chirurgies du tractus génito-urinaire, de tumeurs de la prostate ou de cirrhose hépatique. Lors d'insuffisance hépatique, ce phénomène s'explique par la diminution de synthèse de certains inhibiteurs de la fibrinolyse ( $\alpha_2$  antiplasmine par exemple), la synthèse accrue de plasmine et une clairance réduite en activateurs du plasminogène (36). Chez les patients atteints de cancers, une hyperfibrinolyse due à l'activation du tPA et du système urokinase ou au clivage direct du fibrinogène par des protéases sécrétées par la tumeur, a été relevée. D'autre part, une hyperfibrinogénémie a été notée chez 40 % des patients humains et chez 25 % des chiens atteints de cancers, et pourrait expliquer ainsi certains résultats positifs de PDF si une hyperfibrinolyse entrait en jeu (45). Dans ces cas d'hyperfibrinolyse primitive, les dosages des D-Dimères restent quant à eux normaux.

### III.2.2. *D-Dimères et diagnostic des thromboses veineuses et embolies pulmonaires*

Les valeurs de D-Dimères se trouvent également élevées lors de thromboses veineuses et de thromboembolies pulmonaires. Cette observation ne trouve pour le moment son application qu'en médecine humaine, mais devrait être bientôt utilisée en médecine vétérinaire. En médecine humaine, l'embolie pulmonaire est reconnue, études nécropsiques à l'appui, comme une cause mortelle primaire ou associée dans 84% des cas. Ces chiffres s'expliquent par le fait que cette affection est souvent sous-diagnostiquée et peu suspectée avant la mort, du fait d'une clinique peu fiable (29). Ainsi, l'enjeu crucial de cette affection réside dans le développement de techniques rapides, spécifiques et non-invasives de diagnostic afin d'éviter la mise en place inutile de techniques de diagnostic coûteuses et invasives. De ce fait, **le principal intérêt du dosage des D-Dimères en médecine humaine réside dans l'exclusion des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires.** Cette exclusion permet d'éviter des examens complémentaires coûteux ou invasifs comme une phlébographie ou un doppler dans le premier cas, un scanner hélicoïdal, une scintigraphie

de ventilation/reperfusion ou une angiographie pulmonaire dans le second cas (4). En effet, un taux inférieur à 500 µg/l (test ELISA commercialisé par STAGO) permet d'exclure raisonnablement le diagnostic de thrombose veineuse profonde (sensibilité: 96.8%) (5) ou d'embolies pulmonaires (96.2%). De plus, des valeurs prédictives négatives restent hautes dans tous les essais cliniques réalisés (29), et permettent au clinicien d'exclure la présence d'embolie pulmonaire dans un contexte de faible probabilité prétest.

### **III.3. Limites du test des D-dimères**

**La principale limite de ce test est son défaut de spécificité**, aussi bien dans le diagnostic d'une CIVD que dans celui d'une maladie thromboembolique. En effet, en médecine humaine, une élévation des taux de D-Dimères a été relevée dans de nombreuses conditions, notamment lors de chirurgie récente, de grossesse, de cancer et dans un grand nombre d'états inflammatoires généralisés (1). Une étude prospective récente a montré également que des patients traumatisés gardaient des valeurs élevées pendant plus de 14 jours après leur hospitalisation, rendant inutile tout test d'exclusion d'embolie pulmonaire ou de thrombose veineuse par les D-Dimères (24). Des valeurs de D-Dimères anormalement élevées chez des patients sains ont également été rapportées, à cause d'interférences pouvant être dues à des réactions antigènes/anticorps, à des anticorps anti-animaux (utilisés dans les réactions immunologiques), à l'hémolyse ou à des médicaments : ceci rappelle au clinicien de toujours replacer un test de laboratoire dans un contexte clinique, surtout quand on utilise des tests faisant appel à des réactions immunes. Dans ces cas de valeurs anormalement élevées chez des sujets sains, des tests utilisant une autre méthode de dosage immunologique, ont révélé des valeurs dans les intervalles de référence (38).

**La faible spécificité du dosage des D-Dimères nous engage donc à l'utiliser (surtout en médecine vétérinaire où il entre dans le diagnostic des CIVD) non comme un test isolé, mais comme un test d'appoint, à confronter *a minima* à la mesure des temps de coagulation et au comptage plaquettaire, le tout replacé dans un contexte clinique donné.**

D'autre part, selon la méthode de dosage, les valeurs diagnostiques d'un test peuvent différer : pour les D-Dimères, l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est la méthode de référence présentant la meilleure sensibilité. Des méthodes immunoturbidimétriques ont montré des sensibilités comparables, alors que les méthodes au

latex ont démontré des performances insuffisantes avec des sensibilités de 80 % seulement (4).

On comprend dès lors que la connaissance des performances d'un test est très importante et permet de savoir quel crédit accorder à un résultat de laboratoire.

### **III.4. Méthodes de dosage des D-Dimères**

Le dosage des D-Dimères fait appel à des méthodes immunologiques utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre l'épitope D-D.

Dans la méthode ELISA type sandwich, qui est la méthode de référence, des anticorps monoclonaux spécifiques sont fixés sur une cupule. Après incubation avec le plasma, les anticorps ont fixé les D-Dimères qui, après lavage, sont révélés par un second anticorps marqué à la peroxydase. Ces méthodes sont les plus sensibles et les plus spécifiques mais l'analyse dure 2 heures et les rend inutilisables dans le cadre de l'urgence et du dosage individuel. Des méthodes rapides ELISA sur membrane ont été mises en place et permettent un dosage semi-quantitatif mais aussi performant que celui de la méthode de référence (37).

Dans d'autres méthodes, des anticorps monoclonaux sont fixés sur des billes de latex qui s'agglutinent en présence de D-Dimères. En médecine humaine, le seuil de positivité est de 500 µg/l mais le dosage n'est que semi-quantitatif et bien moins sensible que celui des méthodes ELISA, ce qui le rend hasardeux à utiliser dans l'exclusion des embolies pulmonaires. En revanche ces méthodes présentent l'avantage d'être simples et rapides. D'autre part, même si la spécificité reste faible, ces tests peuvent être intéressants pour le diagnostic des CIVD en médecine vétérinaire.

Une méthode rapide d'immunofiltration a été également proposée. Une membrane poreuse est recouverte d'anticorps monoclonal, et du plasma est appliqué. Les épitopes D-D sont capturés et révélés par un deuxième anticorps identique mais marqué à l'or colloïdal. Une coloration proportionnelle à la quantité de D-Dimères présents apparaît. Cette méthode a donné lieu à des résultats contradictoires.

Une autre méthode utilise l'agglutination des hématies du sujet à tester, en présence d'un complexe d'anticorps formé d'un monoclonal spécifique anti-D-D et d'un monoclonal anti-globule rouge. Si des D-Dimères sont présents, il y a agglutination. C'est un test semi-quantitatif performant et adapté à l'urgence et au dosage individuel. En revanche, le principe de cette méthode interdit son usage en médecine vétérinaire.

La dernière technique est l'immunoturbidimétrie qui permet de doser rapidement (dix minutes), de manière automatisée et avec une grande sensibilité les D-Dimères. Un kit utilisant cette méthode a déjà été validé en médecine vétérinaire (8) et c'est également sur cette technique que s'appuie notre étude expérimentale. Des anticorps anti-D-Dimères sont fixés à des microparticules de latex. En présence de l'antigène, les microparticules s'agglutinent et entraînent une augmentation de la turbidité du mélange réactionnel. Cette augmentation de turbidité est proportionnelle à la quantité de D-Dimères du plasma et permet ainsi un dosage quantitatif.

### **III.5. Données actuelles sur l'utilisation du test des D-Dimères en médecine vétérinaire**

Les premières investigations concernant les D-Dimères n'ont commencé qu'en 1997. Caldin et al. (6), dans une étude préliminaire ont validé cette année-là un dosage immunoturbidimétrique des D-Dimères (Tina-quant D-Dimer, Boehringer, Mannheim) sur 40 chiens sains et 71 cas de CIVD. L'intervalle de référence déterminé chez les chiens sains était de 0.01- 0.25 µg/ml et la sensibilité dans le groupe CIVD était de 82% avec un seuil de positivité de 0.25 µg/ml, ce qui était comparable aux performances du dosage des PDF sur sérum ou plasma (sensibilité : 80 – 95% ; spécificité : 90 – 100%) (43).

En 1998, Caldin et al. toujours dans une étude préliminaire (7) ont comparé les performances diagnostiques des dosages des D-Dimères (immunoturbidimétrie), des PDF sur sérum classiquement utilisées et des PDF sur plasma. Sur 36 patients (25 atteints de CIVD et 11 chiens sains), la sensibilité des PDF/plasma était de 72%, légèrement inférieure à celle des D-Dimères (sensibilité : 76%), et s'est révélée supérieure à celle des PDF/Sérum (sensibilité : 40%). Dans la même étude, 178 chiens, incluant 102 cas de CIVD et 76 chiens malades mais atteints d'une affection autre, ont été utilisés pour établir la sensibilité du dosage des PDF/plasma (73.5%) et des D-Dimères (76.5%), et leur spécificité 84.2% et 94.7% respectivement. Cette étude a donc montré que le dosage quantitatif des D-Dimères est une méthode performante de diagnostic de CIVD, à utiliser simultanément au dosage des PDF plasmatiques, afin d'accroître la valeur diagnostique de ces tests (7).

En 2000, Caldin et al. (8) ont publié la validation d'un dosage immunoturbidimétrique des D-Dimères (Tina-quant D-Dimer, Boehringer, Mannheim) et ont établi des intervalles de référence de 0.02 – 0.28 µg/ml à partir d'une étude menée sur 70 chiens sains.

En 2000, Stokol et al. ont pour la première fois validé un kit de dosage rapide des D-Dimères utilisant l'agglutination au latex (D-Dimer Assay, Pacific Hemostasis) (44). Le test d'agglutination au latex s'est révélé 100% sensible chez 20 chiens atteints de CIVD et 97% spécifique sur 30 chiens sains. Les dosages de PDF sur plasma et sérum ont montré des sensibilités et spécificités inférieures mais ces résultats n'étaient pas statistiquement différents. Le dosage des D-Dimères par immunoturbidimétrie (Tina-quant, Boehringer, Mannheim) a permis d'établir un intervalle de référence chez des chiens sains de 0.08 – 0.39 µg/ml. Ce test a montré une spécificité inférieure aux autres méthodes (77%) pour un seuil de positivité de 0.30 µg/ml et une sensibilité inférieure (65%) pour un seuil de 0.39 µg/ml. En revanche, utilisé en parallèle à un dosage des PDF (c'est à dire qu'un test est positif pour une CIVD si un ou l'autre des 2 tests est positif), ce test gagne en sensibilité (90 à 95%), sans perdre en spécificité, avec un seuil à 0.39 µg/ml. A un seuil de 0.30 µg/ml, un test immunoturbidimétrique en série avec un dosage des PDF (c'est à dire qu'un test est positif pour une CIVD si les deux tests sont positifs) améliore la spécificité significativement (93 – 100%). **Ceci suggère que le dosage immunoturbidimétrique pourrait être utilisé simultanément au dosage des PDF, sans pour autant les remplacer comme test diagnostique d'une CIVD. En revanche, les données concernant le test d'agglutination au latex montrent une supériorité des D-Dimères (plus sensible et aussi spécifique que les PDF) qui pourraient remplacer les PDF dans le diagnostic des CIVD.** Cependant, d'autres études seraient nécessaires afin de déterminer la spécificité des PDF et des D-Dimères chez des patients atteints d'une maladie systémique autre que la CIVD. L'étude préliminaire de Caldin et al. (7) aurait tendance à montrer une bonne spécificité dans ce type de population (84% pour les PDF et 95% pour les D-Dimères), mais des études complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ce résultat car comme nous l'avons vu, en médecine humaine, des valeurs hautes de D-Dimères ne sont pas spécifiques d'une CIVD (voir § II.3.3.). Ainsi, en attendant des nouvelles données expérimentales à ce sujet, les D-Dimères et PDF devraient être dosés de façon complémentaire dans le diagnostic des CIVD chez le chien.

## **PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE**

### **I. INTRODUCTION : BUT DE L'ETUDE**

Le but de notre étude est de valider une méthode immunoturbidimétrique de dosage des D-Dimères chez le chien, comme l'ont fait Caldin et al. en 2000 (8), et ce sur un automate d'une autre marque (Sta-Liatest D-Di, Stago, Asnières, France), utilisé dans de nombreux laboratoires français, afin de confirmer les résultats obtenus. Cette étude est préliminaire à l'établissement de valeurs usuelles des D-Dimères chez le chien sain sur cette machine.

L'intérêt de la validation d'une telle technique est d'offrir aux praticiens vétérinaires une nouvelle arme diagnostique en hémostase : en effet, les kits de dosage des PDF, délaissés en médecine humaine, risquent de disparaître à court ou moyen terme et les D-Dimères pourraient bientôt devenir le seul marqueur de fibrinolyse accessible dans le diagnostic des CIVD chez le chien. Ainsi, la validation d'une nouvelle méthode immunoturbidimétrique de dosage des D-Dimères permettrait d'offrir aux cliniciens l'avantage d'une méthode quantitative réalisée en routine en laboratoire d'analyses humaines, comparé à des kits semi-quantitatifs que toutes les cliniques vétérinaires ne possèdent pas.

Enfin, la validation de cette technique est peut-être le point de départ d'autres études où la méthode immunoturbidimétrique pourrait être utilisée, comme par exemple le diagnostic des thromboses veineuses et embolies pulmonaires, où elle trouve sa principale utilisation en médecine humaine.

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1. Matériel

#### II.1.1. Récolte des échantillons

Les échantillons sanguins ont été prélevés sur 3 catégories de chiens : des chiens sains, des chiens atteints d'autres affections qu'une CIVD et de chiens atteints de CIVD. Pour cette dernière catégorie, des critères cliniques et biologiques ont été déterminés. Les critères cliniques se caractérisaient soit par la présence d'une affection fréquemment associée à une CIVD ( voir Partie I, § II.1.1.), soit par des commémoratifs de saignements multifocaux ou de chirurgie récente. Les critères biologiques se basaient sur au moins deux des éléments suivants : une thrombocytopenie (inférieure à  $150 \cdot 10^9/l$ ), des temps de coagulation augmentés (TCA, TQ ou TT), une augmentation des PDF (supérieurs à  $5 \mu g/ml$ ) et la présence de schizocytes sur le frottis.

Les prélèvements sanguins (4.5 ml par tube), réalisés à la veine jugulaire, ont été effectués sur citrate de sodium (3.8%, 0.5 ml ; Venoject citrate, Terumo, Cestas, France), avec un ratio de 9 : 1. Les tubes ont été centrifugés (5 minutes à 5000 tours/min) dans l'heure suivant le prélèvement et les plasmas ainsi obtenus ont permis de déterminer les temps de coagulation et le dosage des PDF semi-quantitatif (FDP Plasma, Stago, Asnières, France). Le plasma restant a été congelé à  $-20^{\circ}C$ , en attendant la réalisation des dosages immunoturbidimétriques.

Parallèlement, sur les mêmes animaux, du sang a été prélevé sur EDTA afin de déterminer le comptage plaquettaire et la morphologie des globules rouges.

#### II.1.2. Automate de dosage des D-Dimères par immunoturbidimétrie

Le dosage quantitatif des D-dimères a été effectué sur un automate STA, commercialisé par STAGO, avec des réactifs fournis eux aussi par STAGO (STA LIATEST D-DI). Il s'agit d'un dosage immunologique en phase solide dispersée des D-Dimères plasmatiques.

- Principe du dosage :

Le dosage des D-Dimères par Sta-Liatest D-Di est basé sur la mesure photométrique de l'augmentation de turbidité d'une suspension de microsphères de latex : c'est ce qu'on appelle l'immunoturbidimétrie.

Deux anticorps monoclonaux de souris anti D-Dimères humains (8D2 et 2.1.16) sont fixés par liaison covalente sur des microsphères de latex (diamètre 0.1 µm) et stabilisés pour en permettre une conservation prolongée. Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique de longueur d'onde très supérieure au diamètre des particules de latex traverse le mélange, la lumière n'est que très faiblement absorbée. En présence de l'analyte, la réaction antigène/anticorps entraîne une agglutination des particules de latex qui forment des agrégats de taille supérieure à la longueur d'onde du faisceau, et induisent une augmentation de la turbidité du mélange réactionnel qui absorbe alors davantage la lumière. Cette augmentation de turbidité est mesurée à 540 nm pendant 140 secondes. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à la concentration de D-Dimères de l'échantillon testé.

- Composition et utilisation du kit Sta-Liatest D-Di :

Les coffrets Sta-Liatest D-Di comprennent un tampon réactionnel et une suspension de microparticules de latex recouvertes de deux anticorps monoclonaux de souris anti D-Dimères humains puis stabilisées avec de l'albumine bovine. Le coffret est conservé à 2-8°C et stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage.

La calibration est validée par le dosage de plasmas contrôles négatifs et positifs.

Le dosage est effectué en moins de dix minutes : l'automate ajoute 100 µl de tampon au plasma (50 µl), puis après 4 minutes à 37°C, 150 µl de réactif déclenchant est ajouté. La lecture du changement d'absorbance se fait à 37°C pendant 140 secondes et l'automate calcule la concentration en D-dimères correspondante.

## **II.2. Méthodes (33)**

### *II.2.1. Répétabilité*

Nous avons dosé les D-Dimères dans 5 plasmas [1 avec des valeurs hautes de D-Dimères (supérieures à 800 ng/ml), 2 avec des valeurs intermédiaires et 2 avec des valeurs

basses (inférieures à 300 ng/ml)], 10 fois le même jour. Entre les dosages, les échantillons étaient gardés à 4°C. Les plasmas ont été choisis de façon à ce que des valeurs hautes, moyennes et basses soient représentées. Le coefficient de variation (CV) a été calculé en divisant la Standard Deviation (SD) par la moyenne (m) observée.

### II.2.2. *Reproductibilité*

5 plasmas ont été fractionnés en aliquotes et congelés à -20°C puis dosés 10 fois à un ou plusieurs jours d'intervalle. Les plasmas ont été choisis de façon à ce que des valeurs hautes (2 plasmas), moyennes (1 plasma) et basses (2 plasmas) soient représentées. Le CV a été calculé.

### II.2.3. *Linéarité*

La linéarité a été évaluée sur 5 plasmas, dont 2 avec des concentrations en D-Dimères moyennes et 3 avec des concentrations en D-Dimères hautes. Ces échantillons ont été dilués au tampon de Owren Koller (solution tampon à pH = 7.35, commercialisée par Stago) de façon à obtenir les dilutions suivantes : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64. Les résultats de cette analyse ont été comparés aux concentrations attendues dans les échantillons dilués et une analyse de régression linéaire a été effectuée. Dans les données analytiques et statistiques, la moyenne de 2 déterminations a été utilisée comme concentration de D-Dimère dans un échantillon donné.

### II.2.4. *Recouvrement*

Afin d'apprécier le recouvrement, 10 plasmas de concentrations différentes ont été mélangés (300 µl + 300 µl). Les valeurs obtenues sont comparées aux valeurs attendues et une analyse de régression linéaire a été effectuée. La moyenne de deux déterminations a été prise en compte pour chaque mesure. Les pourcentages de recouvrement ont été obtenus en calculant le ratio valeur obtenue sur valeur attendue.

### II.2.5. *Effet des conditions de conservation*

- Congélation/décongélation : Les valeurs de D-Dimères de 5 plasmas sont dosés à T0 puis après 1, 3 et 5 cycles congélation-décongélation. Des plasmas de concentrations hautes (1 plasma) , moyennes (2 plasmas) et basses (2 plasmas) en D-Dimères ont été choisis. Lors de chaque cycle, les échantillons sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 1 à 2 heures minimum, puis décongelés au bain-marie ( $37^{\circ}\text{C}$ ) pendant 10 minutes. Ils sont ensuite laissés à température ambiante 5 minutes avant de les soumettre à l'automate. Le CV a été calculé.

- Température ambiante : 5 plasmas de concentrations différentes (hautes, moyennes et basses) sont dosés pour les D-Dimères à T0, T8 heures, T 18 heures, T 24 heures, T48 heures, T 72 heures, en les laissant à température ambiante. Le CV a été calculé.

### III. RESULTATS

#### III.1. Répétabilité

Les coefficients de variation observés s'échelonnent de 4.73% pour les valeurs hautes en D-Dimères à 47.27% pour les valeurs basses. Les résultats sont résumés dans le tableau 3 et représentés sur la figure 7. Les résultats complets sont eux consignés en annexe 1.

Concentrations en D-Dimères	Plasmas	Moyenne (ng/ml)	SD	CV (%)
Valeurs basses	Plasma 1	109	51.52	47.27
	Plasma 2	278	74.8	26.91
Valeurs moyennes	Plasma 3	353	49.9	14.14
	Plasma 4	442	63.21	14.3
Valeurs hautes	Plasma 5	889	42.02	4.73

Tableau 3 : Répétabilité du dosage des D-Dimères

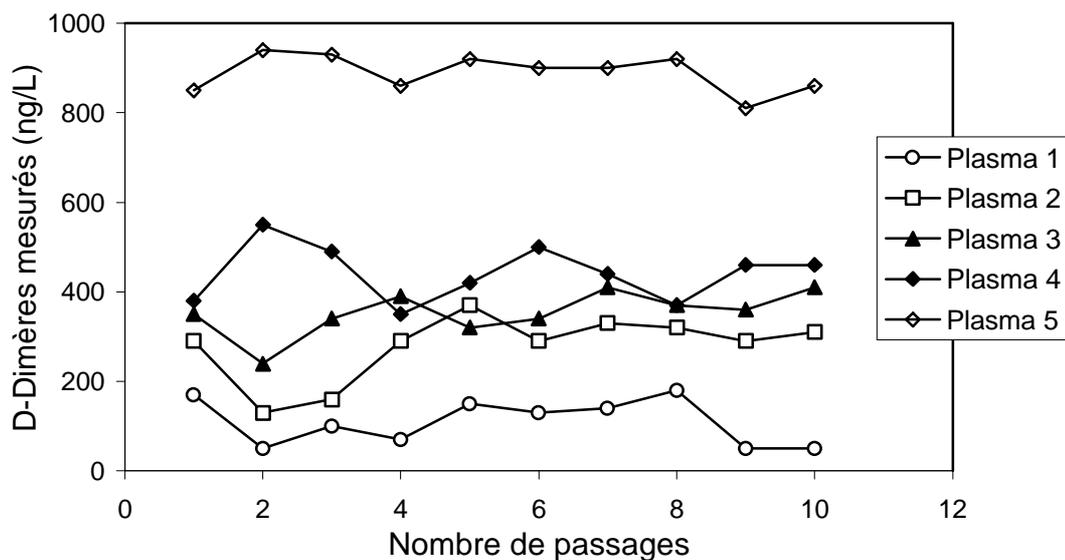


Figure 7 : Répétabilité du dosage des D-Dimères

### III.2. Reproductibilité

Les coefficients de variation observés vont de 5.72% pour les valeurs hautes à 36.26% pour les valeurs basses. Les résultats sont résumés dans le tableau 4 et schématisés sur la figure 8. Les résultats détaillés sont consignés en annexe 2.

Concentrations en D-Dimères	Plasmas	Moyenne (ng/ml)	SD	CV (%)
Valeurs basses	Plasma 1	91	33	36.26
	Plasma 2	237	50.8	21.44
Valeurs moyennes	Plasma 3	406	54.07	13.32
Valeurs hautes	Plasma 4	693	68.56	9.89
	Plasma 5	2664	152.5	5.72

Tableau 4 : Reproductibilité du dosage des D-Dimères

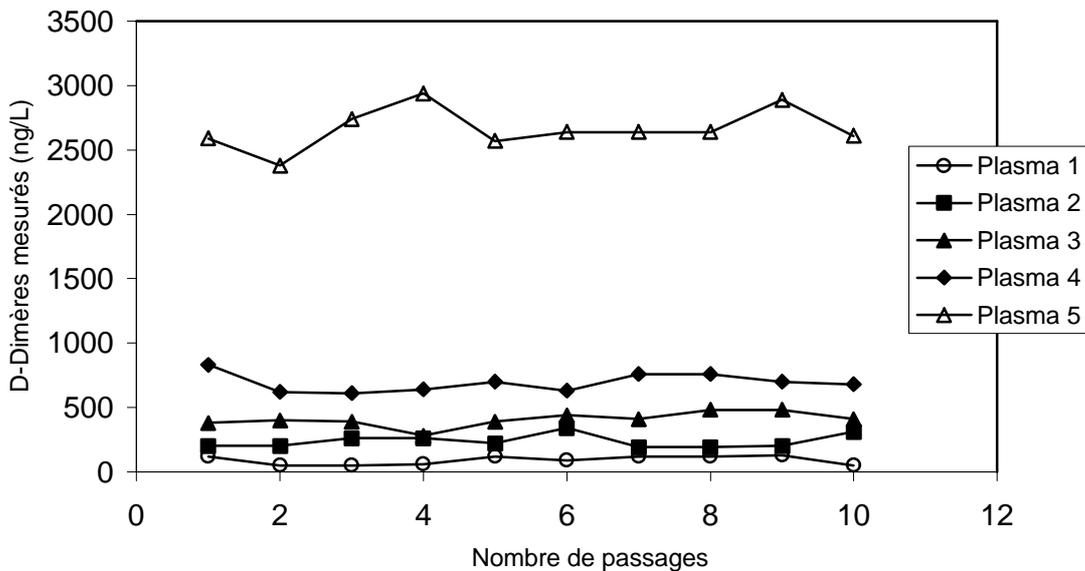
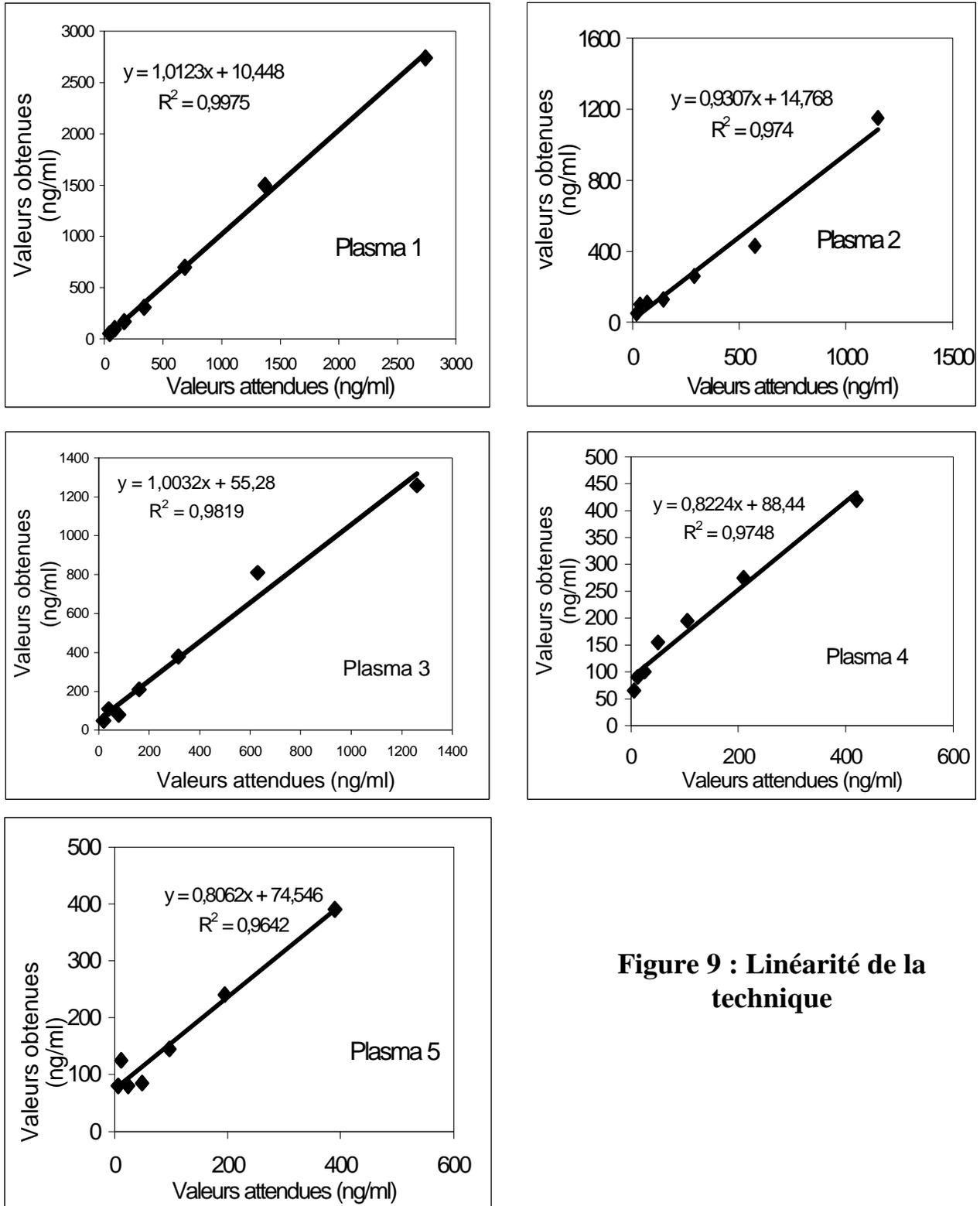


Figure 8 : Reproductibilité du dosage des D-Dimères

### III.3. Linéarité

La régression linéaire appliquée aux différents échantillons dilués a fourni des coefficients de détermination «  $r^2$  » de 0.964 à 0.997. Les différentes droites de régression sont représentées sur la figure 9 et les résultats détaillés sont consignés en annexe 3.



**Figure 9 : Linéarité de la technique**

### III.4. Recouvrement

Les résultats de l'étude de recouvrement ont été reportés dans le tableau 5 ci-dessous. L'analyse de régression a permis de dégager un coefficient de détermination de 0.9836. la droite de régression est schématisée sur la figure 10.

	Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3	Mélange 4	Mélange 5
<b>Plasma 1 (ng/ml)</b>	70	85	70	70	170
<b>Plasma 2 (ng/ml)</b>	2640	695	1260	880	880
<b>Valeur attendue (ng/ml)</b>	1355	390	665	475	525
<b>Valeur obtenue (ng/ml)</b>	1585	410	710	535	700
<b>Recouvrement (%)</b>	116,97	105,13	106,77	112,63	133,33

Tableau 5 : Recouvrement

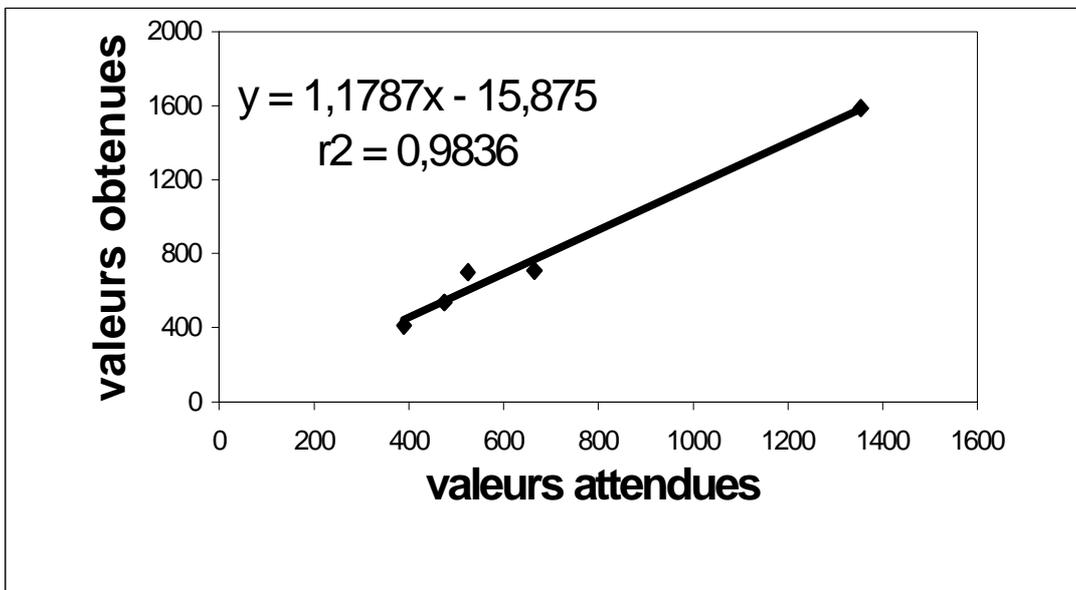


Figure 10 : Recouvrement

### III.5. Effet des conditions de conservation

#### III.5.1. Effet des cycles décongélation/recongélation

Les coefficients de variation de la concentration en D-Dimères des différents échantillons vont de 2.90 pour les valeurs hautes à 45.72 pour les valeurs basses. Les résultats ont été reportés dans le tableau 6 et illustrées par la figure 11. Les données complètes sont retranscrites en annexe 4.

Concentration en D-Dimères	Plasmas	Moyenne (ng/ml)	SD	CV
Valeurs basses	Plasma 1	130	59.44	45.72
	Plasma 2	280	48.30	17.25
Valeurs moyennes	Plasma 3	300	36.97	12.97
	Plasma 4	477	68.50	14.34
Valeurs hautes	Plasma 5	862	25	2.90

Tableau 6 : Effet des cycles décongélation/recongélation sur les concentrations de D-Dimères

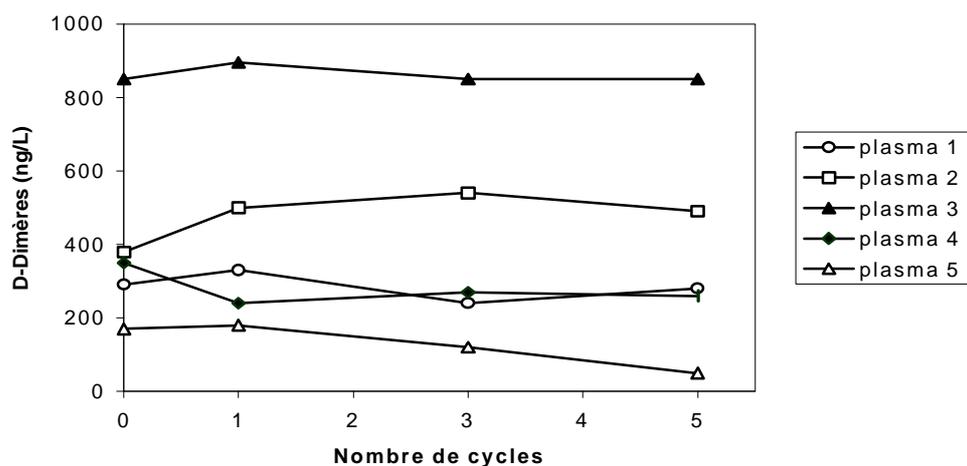


Figure 11 : Effet des cycles de congélation/décongélation sur les concentrations en D-Dimères

### III.5.2. Effet de la température ambiante

Les coefficients de variation s'échelonnent de 13.07% à 41,88%, avec un CV moyen de 24.5%. Les résultats détaillés ont été reportés en annexe 5. L'évolution des concentrations en D-Dimères au cours du temps est représentée sur la figure 12.

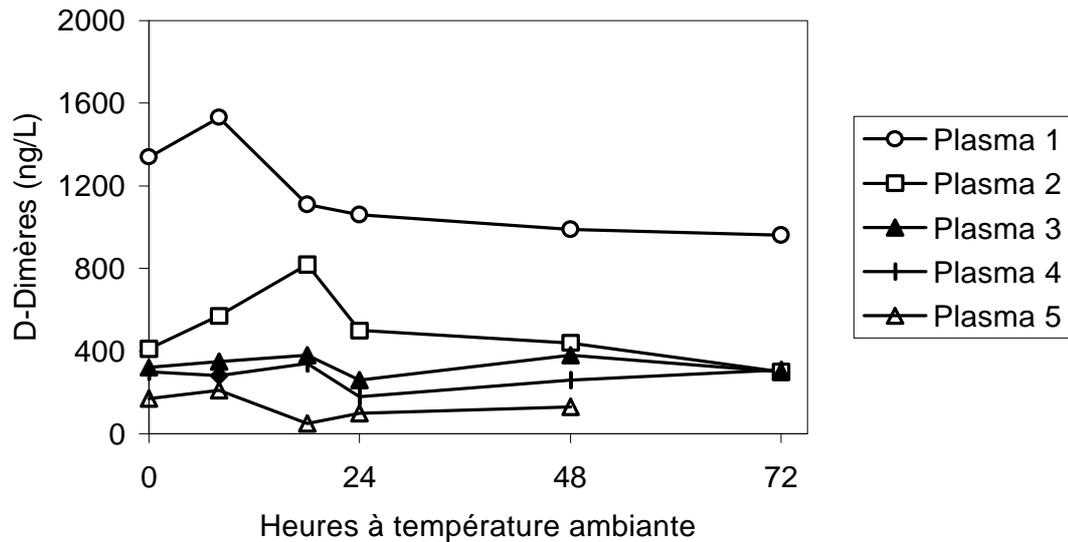


Figure 12 : Effet de la conservation à température ambiante

## IV. DISCUSSION

### IV.1. Rappels sur les caractéristiques métrologiques des techniques analytiques

La connaissance des qualités métrologiques d'une technique analytique semble intéressante pour un analyste, mais, en première approche, plutôt inutile pour un utilisateur de résultats, par exemple un vétérinaire ou un médecin à la recherche d'un diagnostic. Cependant, ce n'est qu'en connaissant la signification analytique d'un résultat chiffré qu'il peut donner une interprétation du résultat et ainsi évaluer l'apport diagnostique de l'analyse. Ainsi semble-t-il particulièrement important pour le praticien de connaître non seulement la méthode utilisée, mais aussi la procédure de validation et les performances analytiques d'un

test ou d'un dosage. Par exemple, comment interpréter deux résultats obtenus deux jours consécutifs chez un chien atteint de CIVD (D-Dimères plasmatiques J1 = 280 µg/l et D-Dimères plasmatiques J2 = 250 µg/l) : sont-ils significativement différents ou non ? Ainsi, il apparaît important de retenir que l'interprétation biologique d'un résultat d'analyse ne peut être faite qu'en ayant une bonne connaissance du degré de confiance que l'on peut accorder à ce résultat.

Afin d'évaluer ce degré de confiance, un certain nombre d'outils sont à notre disposition : ils permettent de pondérer un résultat et de lui accorder plus ou moins d'intérêt diagnostique. Ces outils, qui constituent en fait les qualités du test, sont la spécificité, la sensibilité, l'exactitude et la précision. La spécificité et la sensibilité ont été définies plus haut (Partie I § III.1.); l'exactitude désigne l'aptitude d'une méthode à mesurer correctement la valeur vraie, c'est-à-dire la concentration réelle d'analyte présente dans l'échantillon. Dans la pratique, on évalue l'inexactitude (= biais) c'est-à-dire l'écart entre cette valeur vraie (dans un échantillon de contrôle dont la concentration est connue) et la valeur moyenne mesurée dans cet échantillon. La valeur vraie est en général prédéterminée par une méthode analytique de référence appelée «gold standard », qui est souvent trop lourde et/ou trop coûteuse pour être utilisée en routine. La précision désigne l'aptitude d'une technique à toujours fournir le même résultat pour le même échantillon. On distingue classiquement la précision dans la série (répétabilité) de la précision entre séries (reproductibilité).

La procédure de validation comprend donc la détermination de ces quatre paramètres. Afin de valider le dosage immunoturbidimétrique des D-Dimères chez le chien, nous nous sommes penchés sur la précision du test : répétabilité et reproductibilité. Pour l'exactitude, nous ne disposons pas, en médecine vétérinaire, de « Gold Standard » pour la mesure des D-Dimères du chien, comme la méthode ELISA utilisée en médecine humaine. Cependant, le recouvrement nous a permis d'avoir une estimation de l'exactitude de la technique par rapport à des résultats attendus. Enfin, nous avons étudié l'effet des conditions de conservation sur les prélèvements. En ce qui concerne la détermination de la sensibilité et de la spécificité du test *in vivo*, ils feront l'objet d'une autre étude et seront couplés à l'établissement des valeurs usuelles.

## IV.2. Précision de la méthode

En ce qui concerne la précision, nous avons évalué la répétabilité et la reproductibilité de la méthode. La répétabilité se définit comme l'expression quantitative de la précision quand l'opérateur applique la technique sur le même échantillon, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs, le même jour. Elle est donc peu influencée par les conditions du dosage (opérateur, réactif, température, réglages de la machine), par opposition à la reproductibilité où ces conditions peuvent changer, étant donné que le dosage est alors réalisé sur des aliquotes d'un même échantillon pendant plusieurs jours successifs. (31)

L'étude de répétabilité a montré de bonnes performances sur les valeurs de D-Dimères hautes (CV= 4.7%) et intermédiaires (CV= 14%), mais médiocres sur les valeurs basses (26% et 47%). Les études précédentes avec un autre kit (Boehringer Mannheim) avaient fourni des résultats à peu près similaires, avec toutefois de meilleurs résultats dans les valeurs basses : dans l'étude de Stockol et al.(44), des plasmas avec des teneurs en D-Dimères de 0.16 à 0.64 µg/ml ont montré des coefficients de variation de 2.7 à 14.7% ; pour Caldin et al., la méthode s'était avérée encore plus précise, les CV allant de 2.96% à 7.99% (8), avec des concentrations de D-Dimères allant de 0.028 µg/ml à 0.657 µg/ml, mais avec des analyses réalisées en triple à chaque fois, ceci minorant la variation. Sur plasma humain, la répétabilité du test commercialisé par Stago était également bonne avec des CV allant de 3.6% à 14.8 %, avec cependant pour les valeurs considérées basses des valeurs allant jusqu'à 0.5µg/ml, ce qui était pour nous des valeurs moyennes (35). Ainsi, cette méthode immunoturbidimétrique est bien répétable chez le chien sur les valeurs hautes et moyennes de D-Dimères (supérieures à 0.350 µg/ml) mais perd en précision dans les valeurs basses. Cela ne pose pas de difficulté majeure pour le diagnostic puisque l'établissement des valeurs usuelles, devrait mettre en évidence une valeur seuil de normalité qui devrait se situer dans les valeurs moyennes de D-Dimères (les études précédentes ont mis en évidence des valeurs seuils entre 0.280 et 0.390 µg/ml).

L'étude de reproductibilité a révélé que la méthode était bien reproductible dans les valeurs hautes (CV = 5.7% et 9.9%) et moyennes (CV= 13.3%), mais manquait de précision dans les valeurs basses (CV= 21.4% et 36.3%) comme pour la répétabilité. Les études précédentes avaient montré des CV allant de 5.88% à 10.84% pour Caldin et al. (8) et de 2.7% à 14.7% pour Stockol et al.(44), ce qui était comparable à notre étude sauf dans les valeurs

basses où la méthode a montré un défaut de précision. Le kit Sta-liatest D-Di, lors de sa validation chez l'homme (35) avait montré lui aussi une bonne reproductibilité dans les valeurs moyennes et hautes (CV= 5.2% et 2.8%), mais moins bonnes dans les valeurs dites basses (inférieures à 0.5 µg/ml) avec un CV de 21.6%, tout à fait comparable à nos résultats. Ce léger défaut de précision dans les valeurs basses ne semble donc pas dû à un effet espèce mais pourrait être lié aux performances intrinsèques du kit. Cependant, ceci ne remet pas en cause la validation du test puisque nous nous trouvons ici *a priori* dans des valeurs éloignées du seuil de normalité qui sera déterminé ultérieurement. D'autre part, il faut noter que nous n'avons pas trouvé de différence marquante entre répétabilité et reproductibilité, ce qui montre que les conditions de dosage influent peu sur les résultats observés. Ceci est un des avantages de l'automatisation des méthodes qui supprime une part de variabilité analytique, à condition que l'appareil soit correctement entretenu et régulièrement étalonné. En effet, apparaît ici un avantage de la méthode quantitative automatisée du dosage des D-Dimères : la reproductibilité du dosage semi-quantitatif est certainement moins bonne du fait, par exemple, de la subjectivité de la lecture du résultat qui peut passer du positif au négatif si l'opérateur change.

Un coefficient de variation de 10-15 % étant généralement accepté (33), **cette méthode de dosage s'est avérée précise à partir de 0.35µg/ml et a montré une précision similaire à celle trouvée lors de la validation de ce test chez l'homme.**

### **IV.3. Linéarité**

**La technique s'est avérée linéaire**, avec des coefficients de détermination «  $r^2$  » entre valeurs attendues et valeurs obtenues de 0.9642 à 0.9975, la corrélation étant meilleure pour des valeurs de D-Dimères hautes au départ. Pour les 5 plasmas testés, les dilutions extrêmes (au 1/32 et 1/64) ont montré une perte de linéarité due au défaut de précision de la technique dans les valeurs basses. L'étude de Caldin et al. (8) avait montré également une excellente linéarité de la technique, même dans les valeurs basses, mais les dilutions n'allaient que jusqu'au 1/8.

#### **IV.4. Recouvrement**

L'exactitude d'évaluation d'une concentration de D-Dimères dans un plasma canin citraté a été examinée par la méthode du recouvrement. Cette technique a été choisie car il n'existe pas d'échantillons de D-Dimères canins purs concentrés, pas plus qu'une technique de dosage vraiment spécifique des épitopes canins, comme la méthode ELISA humaine.

On note une bonne corrélation entre les valeurs obtenues et les valeurs attendues («  $r^2$  » = 0.9836) et des pourcentages de recouvrement corrects, si on tient compte de la variation inhérente à la technique, observée dans l'étude de la précision. En théorie, les pourcentages de recouvrement devraient être de 100%. Des valeurs supérieures peuvent indiquer la présence d'interférences, comme par exemple des réactions antigène-anticorps, avec des réactifs utilisés dans le dosage, à la différence de la linéarité où les dilutions étaient faites avec une solution tampon. Cependant, la précision de la technique ne nous permet pas de conclure à ce sujet. La spécificité de la technique pourra être étudiée plus avant lors de l'établissement des valeurs usuelles de D-Dimères chez le chien.

#### **IV.5. Effet des conditions de conservation :**

**Les cycles congélation/décongélation n'ont pas affecté les concentrations en D-Dimères des différents échantillons**, notamment dans le sens d'une diminution, comme le craignait Stokol (44) : les CV observés sont comparables à ceux observés dans les études de répétabilité et reproductibilité. Seul un échantillon avec des valeurs de D-Dimères basses passe de 170 ng/ml à 50 ng/ml après 5 cycles (CV = 45.7%), mais ceci est probablement dû à l'imprécision de la technique dans les valeurs basses puisque de telles variations ont été observées dans les études de répétabilité et reproductibilité. Ceci montre donc que l'on peut faire subir au moins 5 cycles de décongélation/recongélation sans modifier les résultats de concentration obtenus. Cette expérience n'avait pas été menée auparavant et aucune information à ce sujet n'apparaît sur la notice d'utilisation du kit qui mentionne une conservation d'1 mois à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Stokol et al. ont montré que les plasmas canins pouvaient être stockés à  $-25^{\circ}\text{C}$  pendant plus d'un mois pour le kit commercialisé par Boehringer et n'ont pas noté d'apparition de faux négatifs ou faux positifs après 11 mois de congélation (44). Ces résultats devraient être confirmés sur le kit commercialisé par Stago.

Le fabricant mentionne une durée de conservation des échantillons de 8 heures à 20°C. Nos résultats se sont avérés en accord avec cette durée de conservation à température ambiante : à T8 heures, toutes les valeurs mesurées n'étaient pas significativement différentes des concentrations mesurées à T0, c'est à dire que les intervalles de confiance à 95% de ces valeurs se chevauchaient. Pour calculer les intervalles de confiance, nous avons utilisé la SD déterminée dans les études de reproductibilité pour des valeurs de D-Dimères équivalentes (hautes, moyennes ou basses). Cependant, nous avons noté dans 4 plasmas sur 5 une tendance à l'augmentation des résultats à T6 heures, sans que nous puissions l'expliquer. Pour les temps de conservation plus longs, nous avons obtenu des résultats hétérogènes qui rendent hasardeuse la mesure des D-Dimères et pourraient conduire à des erreurs diagnostiques : 2 échantillons (plasma 3 et 4) se sont bien conservés pendant 72 heures tandis que le plasma 5 s'est conservé correctement 48 heures avant de subir une transformation physique (gélification), rendant impossible la mesure à T72 heures. Le plasma 2 a vu sa concentration en D-Dimères doubler par rapport à la mesure initiale à T24heures, alors que les concentrations en D-Dimères du plasma 1 ont baissé de façon significative à partir de T24 heures. Ainsi, **il paraît raisonnable de réaliser le dosage des D-Dimères dans les 8 heures suivant le prélèvement (si les échantillons sont laissés à température ambiante) ou suivant leur décongélation.**

Il serait également intéressant lors d'une étude ultérieure de déterminer la stabilité des échantillons à une température de réfrigération.

## IV.6. Perspectives

Le protocole mis en œuvre nous a permis d'établir que cette technique de dosage immunoturbidimétrique était fiable au plan analytique. L'étape suivante sera donc d'établir les valeurs usuelles des D-Dimères fournies par le kit Sta-liatest D-Di et de déterminer les performances diagnostiques de ce test, à savoir la sensibilité et la spécificité. Des valeurs usuelles ont déjà été établies sur un kit (6, 8, 44) mais il serait intéressant de pouvoir comparer les performances de ces deux kits.

Ensuite, si les études déjà menées ont permis de déterminer la spécificité du test en prenant une population atteinte de CIVD et une autre saine, il serait intéressant de déterminer cette spécificité chez des sujets atteints de pathologies autres qu'une CIVD. Nous ne disposons à ce sujet que de résultats préliminaires (7) qui sont certes encourageants mais qui

mériteraient d'être confirmés. En effet, comme nous l'avons vu dans la partie 1, de nombreuses conditions autres qu'une CIVD entraînent des augmentations des concentrations en D-Dimères chez l'homme et nous devrions examiner si cette observation s'applique au chien et si oui, à quelles conditions sont associées de telles augmentations.

## **CONCLUSION**

Notre étude expérimentale a permis de valider cette méthode de dosage immunoturbidimétrique chez le chien. La technique s'est avérée fiable et linéaire. D'autre part, nous avons pu étudier l'effet des conditions de conservations sur les concentrations en D-Dimères, ce qui nous a permis d'établir que les dosages devaient être réalisés dans les 8 heures suivant le prélèvement si les échantillons restaient à température ambiante. Il a été montré que les cycles de décongélation/recongélation n'altéraient pas ces concentrations.

La validation de ce test devrait permettre d'approfondir les connaissances concernant les D-Dimères en établissant des valeurs usuelles et en déterminant la sensibilité et la spécificité de ce kit dans le diagnostic des CIVD, de façon à le comparer aux performances des autres kits déjà évalués. Ceci devrait permettre en particulier de déterminer si les dosages quantitatifs sont supérieurs aux dosages semi-quantitatifs, ce qui n'est pas encore parfaitement établi, les avis divergeant à ce sujet.

Enfin, si les travaux sur l'utilisation des D-Dimères en médecine vétérinaire se poursuivent, nous pourrions envisager l'utilisation de ce test dans le diagnostic d'autres affections comme les thromboses pulmonaires du chien ou les thromboses aortiques du chat.

De plus, des applications dans d'autres espèces sont à envisager puisque les niveaux de D-Dimères semblent être des indicateurs pronostiques dans les coliques du cheval.



## ANNEXES

CHIENS	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6	MES 7	MES 8	MES 9	MES 10	m	SD	CV
1	290	130	160	290	370	290	330	320	290	310	278	74,8	26,91
2	380	550	490	350	420	500	440	370	460	460	442	63,21	14,3
3	850	940	930	860	920	900	900	920	810	860	889	42,02	4,73
4	350	240	340	390	320	340	410	370	360	410	353	49,9	14,14
5	170	50	100	70	150	130	140	180	50	50	109	51,52	47,27

### Annexe 1 : Répétabilité

CHIENS	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6	MES 7	MES 8	MES 9	MES 10	m	SD	CV
1	380	400	390	280	390	440	410	480	480	410	406	54,07	13,32
2	830	620	610	640	700	630	760	760	700	680	693	68,56	9,894
3	200	200	260	260	220	340	190	190	200	310	237	50,8	21,44
4	2590	2380	2740	2940	2570	2640	2640	2640	2890	2610	2664	152,5	5,725
5	120	50	50	60	120	90	120	120	130	50	91	33	36,26

### Annexe 2 : Reproductibilité

CHIENS	PLASMA PUR	DIL. 1/2	DIL. 1/4	DIL. 1/8	DIL. 1/16	DIL. 1/32	DIL. 1/64
1	2740	1500	700	310	170	100	50
2	1150	430	260	130	110	100	50
3	1260	810	380	210	80	110	50
4	420	275	195	155	100	90	60
5	390	240	145	85	60	90	70

### Annexe 3 : Linéarité

CHIENS	TO	1 CYCLE	3 CYCLES	5 CYCLES	m	SD	CV
1	290	330	240	280	285	36,97	12,97
2	380	500	540	490	477,5	68,5	14,35
3	850	900	850	850	862,5	25	2,90
4	350	240	270	260	280	48,3	17,25
5	170	180	120	50	130	59,44	45,72

**Annexe 4 : Effet des cycles décongélation/recongélation**

CHIENS	T0	T8h	T18h	T24h	T48h	T72h	m	SD	CV
1	1340	1530	1110	1060	990	960	1165	204,35	17,54
2	410	570	820	500	440	300	506,7	162,65	32,10
3	320	350	380	260	380	300	331,7	43,37	13,07
4	300	280	340	180	260	310	278,3	50,47	18,13
5	170	210	50	100	130	Plasma gélifié	132	55,28	41,88

**Annexe 5 : Effet de la conservation à température ambiante**

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. ANDERSON, D.R., WELLS, P.S.  
D-Dimer for the diagnosis of venous thromboembolism  
*Curr. Opin. Hematol.*, 2000, **7** : 269-301.
2. BAUER, K.A., KASS, B.L., Cate, H.T., HAWIGER, J.J., ROSENBERG, R.D.  
Factor IX is activated in vivo by the Tissue Factor mechanism  
*Blood*, 1990, **76** (4) : 731-736.
3. BONEU, B., CAZENAVE, J.P.  
*Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose.*  
Boehringer Ingelheim, Reims. 2<sup>ième</sup> édition, 1997, 281 pages.
4. BOUNAMEAUX, H.  
Valeur du D-Dimère dans l'approche diagnostique de la maladie thromboembolique veineuse.  
*Sang Thrombose Vaisseaux*, 1992, **4** (4): 255-259.
5. BOUNAMEAUX, H., DE MOERLOOSE, P., PERRIER, A., REBER, G.  
Plasma measurement of D-Dimer as diagnostic aid in suspected venous thromboembolism: an overview.  
*Thrombosis and haemostasis*, 1994, **71** (1) : 1-6.
6. CALDIN, M., FURLANELLO, T., BERTO, D., LUBAS, G.  
Preliminary investigations of D-Dimer concentrations in normal dogs and dogs with Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) [abstract]  
*J Vet Intern Med.*, 1997, **11** : 130.
7. CALDIN, M., FURLANELLO, T., LUBAS, G.  
Sensitivity and specificity of citrated plasma FDPs and D-Dimer in the diagnosis of Disseminated intravascular Coagulation (DIC) in dogs. [abstract]  
*J Vet Intern Med.*, 1998, **12** : 236.
8. CALDIN, M., FURLANELLO, T., LUBAS, G.  
Validation of an immunoturbidimetric D-Dimer Assay in canine citrated plasma  
*Vet Clin Pathol.*, 2000, **29** (2) : 51-54.

9. COUTO, C.G.  
Disorders of hemostasis  
In : NELSON, R.W., COUTO, C.G.  
*Small Animal Internal Medicine*  
Saint Louis : Mosby, 1998, 1192-1206.
  
10. DARIEN, B.J.  
Fibrinolytic system  
In : FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C.  
*Veterinary Hematology*  
Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 5<sup>ème</sup> édition, 2000, 544-548.
  
11. DELAMARE, J.  
Le Garnier-Delamare. Dictionnaire des termes de médecine  
Maloine, Paris, 25<sup>ème</sup> édition.1998, 973 pages.
  
12. DIQUELOU, A.  
Physiologie de l'hémostase  
E.N.V.T., Certificat d'études supérieures d'hématologie et de biochimie clinique  
animales, Document pédagogique, 2000. 19 pages.
  
13. ENGEN, M.H., WEIRICH, W.E., LUND, J.E.  
Fibrinolysis in a dog with diaphragmatic hernia.  
*J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1974, **164** : 152-153.
  
14. FELDMAN, B.F., MADEWELL, B.R., O'NEILL, S.  
Disseminated Intravascular Coagulation : antithrombin, plasminogen and coagulation  
abnormalities in 41 dogs.  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1981, **179** : 151-154.
  
15. FELDMAN, B.F., THOMASON, K.J., JAIN, N.C.  
Quantitative platelet disorders  
*Vet. Clin. North Am.: Small animal practice*, 1988, *18 (1)*: **35-49**.
  
16. FELDMAN, B.F., KIRBY, R., CALDIN, M.  
Recognition and treatment of disseminated intravascular coagulation  
In *KIRK: Current Veterinary Therapy XIII*  
WB Saunders Company, Philadelphia, 2001: 190-194.

17. FURIC, F., HERIPRET, D., OLIVRY, T.  
La coagulation intravasculaire disséminée chez le chien. Première partie: rappels théoriques.  
*Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1992, **27** (6): 753-764
  
18. FURIC, F., HERIPRET, D., OLIVRY, T.  
La coagulation intravasculaire disséminée chez le chien. Deuxième partie: étude retrospective de 20 cas cliniques.  
*Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.*, 1993, **28** : 53-62.
  
19. GREEN, R.A.  
Pathophysiology of Antithrombin III deficiency.  
*Vet. Clin. North Am.*, 1988, **18** (1): 95-104.
  
20. HAMMER, A.S., COUTO, C.G., SWARDSON, C., GETZY, D.  
Hemostatic abnormalities in dogs with hemangiosarcoma  
*J. Vet. Intern. Med.*, 1991, **5** : 11-14.
  
21. HANDAGAMA, P., FELDMAN, B.F.  
Thrombocytopenia and drugs  
*Vet. Clin. North Am.: Small animal practice*, 1988, **18** (1): 51-65.
  
22. HELGREN, M., EGBERG, N., EKLUND, J.  
Blood coagulation and fibrinolytic factors and their inhibitors in critically ill patients.  
*Intensive Care Med.*, 1984, **10** : 23-28.
  
23. HOLLOWAY, S. A.  
Disseminated Intravascular coagulation  
In : DAY, M., MACKIN, A., LITTLEWOOD, J.  
*Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*  
Gloucester : BSAVA, 2000, 253-259.
  
24. JOHNA, S., CEMAJ, S., O'CALLAGHAN, T., CATALANO, R.  
Effect of tissue injury on D-Dimer levels : a prospective study in trauma patients  
*Med. Sci. Monit.*, 2001, **8** (1) : 5-8.
  
25. KIRBY, R., RUDLOFF, E.  
Acquired coagulopathy : Disseminated intravascular coagulation  
In : FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C.  
*Veterinary Hematology*  
Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 5<sup>ème</sup> édition, 2000, 581-587.

26. LARSON, R.L., CARITHERS, R.W.  
A review of heat stroke and its complications in the canine.  
*N. Z. vet. J.*, 1985, **33** : 202-206.
  
27. MAC CAW, D.L., JERGENS, A.E., TURRENTINE, M.A., JOHNSON, O.S.  
Effect of internal hemorrhage on FDP in canine blood.  
*Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47** (7) : 1620-1621.
  
28. MAC CONNEL, M.F.  
Overview of haemostasis  
In : DAY, M., MACKIN, A., LITTLEWOOD, J.  
*Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*  
Gloucester : BSAVA, 2000, 165-171.
  
29. MAVROMATIS, B.H., KESSLER, C.M.  
D-Dimer testing : the role of the clinical laboratory in the diagnosis of pulmonary embolism.  
*J. Clin. Pathol.*, 2001, **54** : 664-668.
  
30. MILLIS, D.L., HAUPTMAN, J.G., FULTON, R.B.  
Abnormal hemostatic profiles and gastric necrosis in canine gastric dilatation volvulus.  
*Vet. Surg.*, 1993, **22** (2) : 93-97.
  
31. MOLLARD, J.F., NAUDIN, C., DUMONT, G. et al.  
Dictionnaire des termes à l'usage de la validation de techniques. Glossaire.  
*Inform. Sci. Biol.*, 1986, **12**, 285-291.
  
32. MOORE, D.J., WILLIAMS, M.C.  
Disseminated intravascular coagulation: a complication of *Babesia canis* infection in the dog.  
*Journal of the South African Veterinary Association*, 1979, **50** (4): 265-275.
  
33. MURAY, W., PETER, A.T., TECLAW, R.F.  
The clinical relevance of assay validation  
*Compendium Veterinary Continuing Education*, **12**: 1665-1675.
  
34. NARAYANAN, S.  
Current concepts of coagulation and fibrinolysis.  
*Advances in clinical chemistry*, 1998, **33** : 133-168.

35. PERONNET, F., ZURLINDEN, A.  
Evaluation d'une nouvelle technique de dosage des D-Dimères : Sta-Liatest D-Di.  
*Revue française des laboratoires*, 1997, **292** : 97-98.
36. PRATER, M.R.  
Acquired coagulopathy II : liver disease  
In : FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C.  
*Veterinary Hematology*  
Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 5<sup>ème</sup> édition, 2000, 560-564.
37. REBER, G., VISSAC, A-M., DE MOERLOOSE, P., BOUNAMEAUX, H., AMIRAL, J.  
A new, semi quantitative and individual ELISA for rapid measurement of plasma D-Dimer in patients suspected of pulmonary embolism  
*Blood Coagul. Fibrinolysis*, 1995, **6** : 460-463.
38. ROLLER, R.E., LAHOUSEN, T., LIPP, R.W., KORNINGER, C., SCHNEDL, W.J.  
Elevated D-Dimer results in a healthy patient  
*Blood Coagul Fibrinolysis*, 2001, **12** : 501-502.
39. RUIZ DE COPEGUI, R., SULIMAN, H.B., FELDMAN, B.F.  
Disseminated Intravascular Coagulation: present and future perspectives  
*Comp. Haem. Int.*, 1995, **5** : 213.
40. SHAKESPEARE, A.L., ANDERSON, W.I., SCOTT, D.W.  
Infarction of the digits and tail secondary to DIC and metastatic hemangiosarcoma in a dog.  
*Journal of the American Animal Hospital Association*, 1988, **24** : 517-520.
41. SLAPPENDEL, R. J.  
Disseminated Intravascular Coagulation  
*Vet. Clin. North. Am. : Small Animal Practice*, 1988, **18** (1) : 169-184.
42. STOCKAUS, C., Kohn, B., RUDOLPH, R., GIGER, U.  
Correlation of haemostatic abnormalities with tumor stage and characteristics in dogs with mammary carcinoma.  
*Journal of Small Animal Practice*, 1999, **40**: 326-331.
43. STOKOL, T., BROOKS, M., ERB, H., MAULDIN, G.E.  
Evaluation of kits for the detection of Fibrin(ogen) Degradation Products in dogs  
*J Vet Intern Med*, 1999, **13** : 478-484.

44. STOKOL, T., BROOKS, M., ERB, H., MAULDIN, G.E.  
D-Dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular  
coagulation  
*American Journal of Veterinary research*, 2000, **61** (4) : 393-398.
45. THAMM, D.H., HELFAND, S.C.  
Acquired coagulopathy III: Neoplasia  
In : FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C.  
*Veterinary Hematology*  
Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 5<sup>ème</sup> édition, 2000, 565-570.
46. TROY, G.C.  
An overview of hemostasis  
*Vet. Clin. North Am.: Small animal practice*, 1988, **18** (1) : 5-20.

Toulouse, 2002

NOM : MENAUT

PRENOM : PIERRE

TITRE : VALIDATION D'UNE METHODE DE DOSAGE IMMUNOTURBIDIMETRIQUE DES D-DIMERES CHEZ LE CHIEN.

RESUME :

L'objet de cette thèse est la validation d'une méthode immunoturbidimétrique de dosage quantitatif des D-Dimères chez le chien. Dans l'étude bibliographique, les fondements de la physiologie de l'hémostase sont rappelés avant d'aborder la Coagulation IntraVasculaire Disséminée (CIVD) et son diagnostic. Cette affection dans laquelle coexistent des phénomènes de thromboses par hyperactivation de la coagulation et un état d'hypocoagulabilité par consommation des facteurs et plaquettes, entraîne l'activation du système fibrinolytique qui tente de détruire les dépôts de fibrine formés. Ainsi, les marqueurs de fibrinolyse constituent des outils majeurs du diagnostic des CIVD. Parmi eux, les D-Dimères sont aujourd'hui les plus spécifiques d'une fibrinolyse secondaire à la coagulation, alors que les Produits de Dégradation de la Fibrine et du fibrinogène (PDF), utilisés actuellement en routine en médecine vétérinaire, ne permettent pas de distinguer hyperfibrinolyse secondaire et hyperfibrinogénolyse primitive. Des tests de dosage des D-Dimères semi-quantitatifs sur latex ont déjà été validés chez le chien ainsi qu'une méthode immunoturbidimétrique sur un kit Boehringer-Ingelheim. Dans l'étude expérimentale, l'auteur a testé le kit Sta-Liatest D-Di, commercialisé par Stago sur 24 plasmas citratés prélevés sur trois groupes de chiens : sains (n = 6), atteints de CIVD (n = 8) et atteints de troubles autres qu'une CIVD (n = 10). La technique a montré une bonne précision (répétabilité et reproductibilité avec des CV inférieurs à 15%) et une linéarité correcte ( $r^2 = 0.96$  à  $0.99$ ) sauf dans les valeurs basses. Les études de recouvrement se sont avérées concluantes ( $r^2 = 0.98$ ). Les effets du mode de conservation sur les concentrations mesurées ont été établis : les plasmas peuvent être conservés 8 heures à température ambiante et 5 cycles décongélation/recongélation n'affectent pas les concentrations en D-Dimères.

MOTS CLES : D-DIMERES – CIVD – HEMOSTASE – FIBRINOLYSE – VALIDATION DE TECHNIQUE – CHIEN.

---

ENGLISH TITLE : VALIDATION OF AN IMMUNOTURBIDIMETRIC D-DIMER ASSAY IN CANINE CITRATED PLASMA.

ABSTRACT :

The aim of this thesis was the validation of an immunoturbidimetric D-Dimer assay in dogs. In the bibliographic part, the basis of hemostatic physiology and Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) are reminded. In DIC, there is a coexistence of thrombi formation due to hyperactivation of the coagulation process and hypocoagulable state, due to platelet and factors consumption. In the same time, the fibrinolytic system is also hyperactivated in order to restore the vascular permeability. Thus, fibrinolysis markers are considered as important diagnostic tools for DIC. Among these markers, D-Dimers are currently the most specific for fibrinolysis secondary to coagulation whereas traditional Fibrin-Fibrinogen Degradation Products (FDP) assays cannot discriminate between secondary hyperfibrinolysis and primary hyperfibrinogenolysis. Some semi-quantitative D-Dimer latex agglutination and an immunoturbidimetric assay have already been validated in recent studies. In the experimental study, the author assessed the Sta-Liatest D-Di by Stago in 24 citrated plasma harvested on healthy dogs (n = 6), DIC-affected dogs (n = 8) and dogs with diseases other than DIC (n = 10). The assay proved to be precise (intra-assay and inter-assay reproducibility with CV lower than 15%) and linear ( $r^2$  from 0.96 to 0.99) except in the low D-Dimer values. Recovery studies were conclusive ( $r^2 = 0.98$ ). The effects of samples storage conditions on D-Dimer concentrations were established : plasma can be stored for 8 hours at room temperature and 5 freeze/thaw cycles do not affect D-Dimers concentrations.

KEY WORDS : D-DIMERS – DIC – HEMOSTASIS – FIBRINOLYSIS – TEST VALIDATION – DOG.