

DEUXIEME PARTIE :

EXPLORATION DE L'HEMOSTASE

[McCours.com](https://www.mccours.com)

I. EXPLORATION DE L'HÉMOSTASE PRIMAIRE

A. EXPLORATION FONCTIONNELLE GLOBALE

L'exploration fonctionnelle de l'hémostase primaire est réalisée à partir de tests simples à mettre en pratique, mais dont les résultats sont peu précis et peu sensibles. Ils présentent toutefois l'avantage de mettre en évidence les troubles de l'hémostase primaire aussi bien liés à l'activité qu'au nombre de plaquettes.

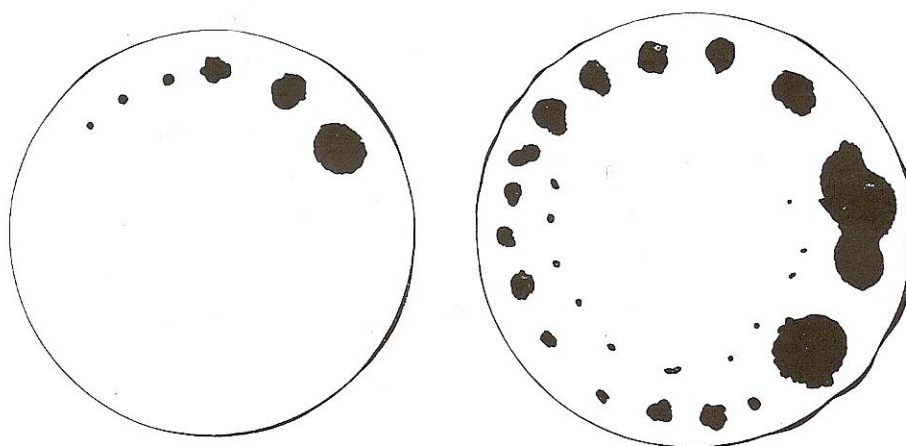
1. Temps de saignement

a. Technique

Le temps de saignement correspond à l'intervalle entre la lésion d'un vaisseau sanguin et l'arrêt du saignement. La lésion vasculaire est réalisée à l'aide d'une aiguille. Une incision peu profonde est faite généralement sur la peau du lobe interne de l'oreille de manière horizontale mais l'incision est aussi possible au niveau de la truffe, des lèvres ou sur le bord plantaire des coussinets. A l'aide d'un papier filtre, les gouttes de sang qui se forment sont absorbées toutes les 30 secondes jusqu'à ce que les saignements stoppent selon une technique inspirée de la technique de Duke en médecine humaine [92].

Le temps de saignement peut également être mesuré au niveau gingival, selon une méthode inspirée de la méthode d'Ivy en médecine humaine [110]. L'animal est placé en décubitus latéral et un lien est placé autour de la mâchoire supérieure de manière à permettre un engorgement veineux modéré de la muqueuse et à placer la babine supérieure en position retournée. Une incision en 2 sites, de 6 mm de long pour 1 mm de profondeur, est réalisée à l'aide d'un dispositif possédant deux lames et le chronomètre est déclenché. Le sang est alors absorbé toutes les 5 secondes à l'aide d'un papier filtre placé à 1 à 2 mm de l'incision (Figure 13). Le temps de saignement correspond alors à la moyenne des temps nécessaires pour juguler les deux saignements.

Figure 13. Aspect du papier filtre suite à la mesure du temps de saignement



Légende : la figure de gauche présente l'aspect du papier filtre pour un temps de saignement normal. A droite, on constate que, dans le cas d'un temps de saignement augmenté, il est possible de récolter du sang pendant un temps beaucoup plus important [92].

b. Interprétation

Les valeurs usuelles de temps de saignement varient énormément selon la technique et l'opérateur. On peut toutefois considérer qu'un temps de saignement normal d'un Chien doit être compris entre 2 et 4 minutes. Il est quand même conseillé que chaque opérateur se fasse sa propre échelle de valeurs sur une population de chiens ou de chats sains. Pour conclure à un allongement du temps de saignement, seules de variations importantes de la mesure sont à prendre en compte (durée supérieure à 5-6 minutes). Jerkens et collaborateurs ont montré que le temps de saignement est utilisable en routine pour prévoir l'intensité d'un saignement au cours d'une opération [110]. Ce test reste cependant peu sensible et ne permet pas de mettre en évidence des troubles frustes.

Le temps de saignement renseigne sur les fonctions hémostatiques des vaisseaux et des plaquettes. Ainsi une augmentation de cette mesure peut être due à une anomalie provenant :

- d'une thrombopénie ou d'une thrombopathie,
- d'une maladie de von Willebrand,
- d'une afibrinogénémie,

- d'une anomalie des vaisseaux,
- d'une anémie sévère.

D'autre part, lorsqu'une incision se remet à saigner, il faut alors suspecter un trouble de la coagulation plasmatique, puisque la reprise des saignements est alors due à une fragilité du clou plaquettaire.

c. Causes d'erreurs :

Une vascularisation trop pauvre ou trop riche de l'oreille ou de la gencive peut engendrer des modifications majeures des résultats. Il faut également veiller à réaliser les mesures dans des conditions minorant les effets de la température ou du stress pour limiter la vasoconstriction ou à l'inverse la vasodilatation. Il faut aussi éviter, avant de mesurer le temps de saignement au niveau de l'oreille, tout frottement ou lavage intempestif responsable d'une congestion veineuse.

Une incision qui serait trop petite peut amener l'opérateur à ne pas mettre en évidence un allongement discret de la durée de l'hémostase. D'autre part chez des individus suspects de trouble majeur de l'hémostase, une incision trop profonde peut causer une hémorragie importante difficile à gérer. Il est ainsi inutile, dans le cadre de la mesure du temps de saignement gingival, de continuer la mesure au bout de 20 minutes si l'animal continue de saigner [110].

2. Temps de rétraction du clou plaquettaire [90]

L'observation de la rétraction du clou plaquettaire permet l'exploration des propriétés contractiles des plaquettes. A l'état physiologique, elle commence à partir d'une heure chez le chien.

a. Technique

On réalise un prélèvement sanguin sur l'animal et le sang est placé dans un tube sec dans une étuve à 37°C. La rétraction se traduit alors par le décollement du caillot de la paroi du tube et par l'exsudation de sérum. On considère que la rétraction est complète si le volume de sérum exsudé est voisin du volume total de sérum exsudable calculé à partir de l'hématocrite (Figure 14).

b. Interprétation et causes d'erreurs

La rétraction du caillot est considérée comme normale si elle est complète en moins de 3 heures.

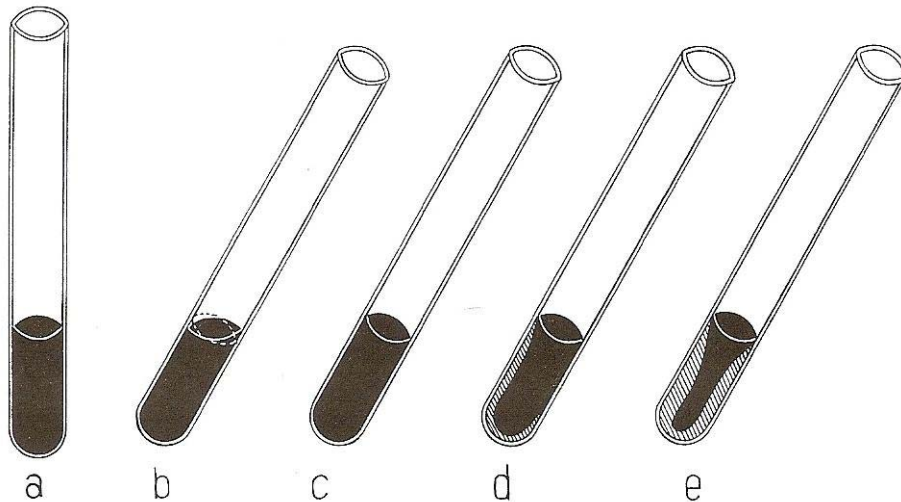
Elle est anormale lors de :

- thrombopénies,
- certaines thrombopathies,
- polyglobulies.

Ce test est peu précis et peu sensible.

Il convient de faire attention aux fausses irrétractilités du caillot qui apparaissent lors de souillure ou d'irrégularité des parois des tubes ou lors de tube laissé à une température trop basse.

Figure 14. Mesure du temps de coagulation [92]



Légende : la figure présente une schématisation de la mesure du temps de coagulation. Le tube a correspond au temps t_0 . On constate qu'au cours du temps (du tube b au tube e), progressivement, le caillot se rétracte jusqu'à une limite représentée par le tube e.

B. NUMÉRATION PLAQUETTAIRE ET FROTTIS SANGUIN

La numération plaquettaire est un test sanguin, simple à mettre en place, qui peut être réalisé, soit par des compteurs globulaires en laboratoire (automates), soit par le vétérinaire praticien à l'aide d'un hématimètre, mais cette méthode est plus délicate et moins précise.

La réalisation de ce test nécessite un prélèvement sanguin qui est à recueillir sur EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) et la numération est à effectuer le plus rapidement possible dans les 10 minutes suivant le recueil.

1. Numération plaquettaire par automate

Il existe deux types de fonctionnement des automates :

- la plupart des automates utilise le principe Coulter avec une détection volumétrique des cellules par variation d'impédance,
- quelques automates utilisent la détection optique des cellules à l'aide de la technique laser.

La numération plaquettaire s'effectue en pratique en même temps que le reste de l'hémogramme. L'avantage de l'automate est sa capacité à analyser des centaines de cellules sur chaque échantillon. D'autre part les automates mesurent aussi d'autres paramètres : le thrombocrite (équivalent de l'hématocrite pour les plaquettes) et le volume plaquettaire moyen. Ils fournissent également la courbe de répartition du volume plaquettaire qui permet de calculer l'indice de distribution des plaquettes (IDP). L'IDP donne des indications sur le degré d'anisocytose plaquettaire.

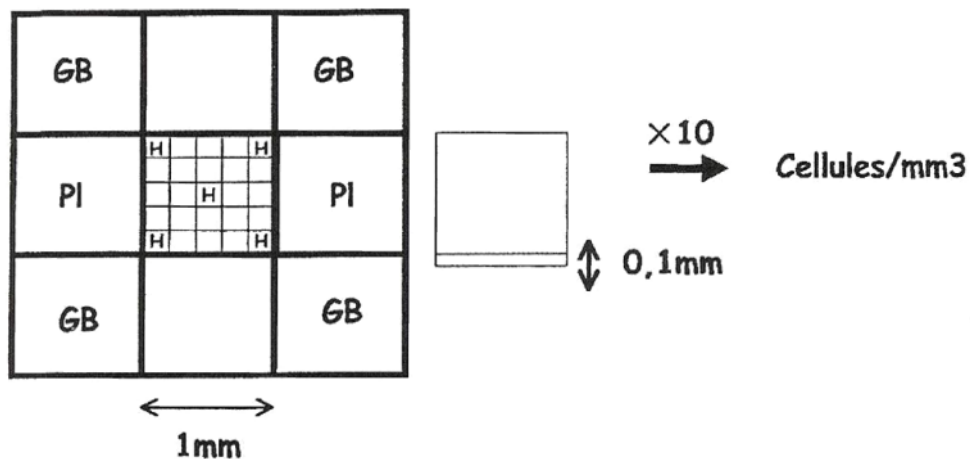
Toutefois un contrôle manuel est à réaliser en complément des valeurs obtenues. En effet, l'EDTA entraîne parfois l'agglutination des plaquettes avec formation d'agrégats plaquettaires comptés par l'automate comme une seule entité d'où une sous-estimation parfois très importante du nombre de thrombocytes. Cette agrégation est aussi possible dans certaines situations pathologiques.

2. Numération plaquettaire manuelle [16]

Comparée à la numération plaquettaire réalisée par automate, cette méthode apparaît longue et peu précise, mais elle reste la méthode de référence.

L'échantillon sanguin est prélevé sur EDTA puis est dilué dans de l'oxalate d'ammonium qui lyse les hématies. Après hémolyse complète (au bout d'environ 10 minutes), quelques gouttes de la solution obtenue sont placées dans un hématimètre. L'hématimètre est une lame contenant dans son épaisseur une chambre de dénombrement. Chacune de ses faces est divisée en 9 carrés et chaque carré central est divisé en 25 petits carrés dans lesquels sont dénombrés les thrombocytes. Les plaquettes apparaissent comme des petits corps réfringents en faible concentration et sont aisément distinguables des leucocytes, les hématies ayant été lysées. Cette technique permet le décompte des plaquettes se trouvant dans un carré de 1 mm de côté. L'hématimètre mesurant 0.1 mm d'épaisseur, il suffit alors de multiplier le nombre de plaquettes dénombrées par 10 pour obtenir la numération plaquettaire par mm^3 (Figure 15).

Figure 15. Aspect de l'hématimètre [16]



Légende : chaque cellule de l'hématimètre a un volume de 0.1 mm^3 (1 mm de côté sur 0.1 mm de profondeur). Ainsi le décompte du nombre de plaquettes dans une cellule permet de déduire le nombre de plaquettes par mm^3 en multipliant le résultat obtenu par 10.

Une autre technique encore moins précise consiste à estimer le nombre de plaquettes par champ à l'objectif à immersion (X 100) dans une zone où le frottis où les cellules sont en monocouche. Pour McConnell (2000) une plaquette observée par surface équivaut à $15\,000 \text{ plaquettes/mm}^3$ [154]. Par conséquent, on doit observer entre 8 et 20 plaquettes par champ. Cette approximation permet de déceler les thrombopénies majeures.

3. Interprétation de la numération plaquettaire [16]

Même si les valeurs varient selon les auteurs, chez un chien sain, la numération plaquettaire est comprise entre 200 000 et 500 000 plaquettes / mm³.

On considère qu'en dessous de 50 000 plaquettes / mm³, l'hémostase est affectée de manière importante et l'animal (Chien ou Chat) est en danger de mort pour des valeurs inférieures à 1 000 plaquettes / mm³. La numération plaquettaire permet donc la mise en évidence des thrombopénies mais en aucun cas des thrombopathies. Aussi lors de troubles génétiques, la numération plaquettaire aura un intérêt de suivi de la fonction hémostatique mais en aucun cas de diagnostic.

4. Frottis sanguin

Le frottis sanguin est réalisé à partir de sang récolté sur EDTA. Une goutte est étalée sur lame puis la lame est colorée, le plus souvent par la coloration de May Grünwald Giemsa, coloration de référence [16].

L'observation de la lame à faible objectif (X 10 à X 40) permet de mettre en évidence des amas plaquettaires, le plus souvent à l'extrémité et sur les bords du frottis. Cette détection est importante pour éviter une sous-estimation. Le faible objectif donne une idée de la richesse en plaquettes de la lame. Quant à l'observation à l'objectif X 40, elle permet de déceler une éventuelle anisocytose plaquettaire par l'analyse de la morphologie plaquettaire.

C. AUTRES TESTS DISPONIBLES

1. Evaluation du facteur de von Willebrand

a. Dosage de la quantité de facteur de von Willebrand

Le dosage du facteur de von Willebrand se fait par différentes techniques immunologiques qui permettent la mise en évidence de l'antigène, vWF:Ag. Pour autant cette méthode ne préjuge pas de l'activité du vWF.

a. Immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse (méthode de Laurell) est longtemps restée la méthode la plus utilisée. Pour cela différentes dilutions du plasma sont mises en présence d'anticorps anti-vWF:Ag. Ensuite la hauteur des différents pics obtenus suite à la migration sur un gel d'agarose sous une tension par centimètre linéaire connue, permet par comparaison entre divers plasmas de déterminer la concentration en vWF:Ag. Cette méthode est sensible et assez précise mais présente l'inconvénient de nécessiter des conditions expérimentales précises et donc reste peu adaptée à une utilisation en routine en médecine vétérinaire. Qui plus est, à ce jour, il n'existe pas de test validé chez le Chien contrairement au test ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*).

Il existe également en médecine humaine des dosages immunologiques à l'aide de test ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) ou de test IRMA (*Immune-RadioMetric Assay*) [16].

β. Technique ELISA [16]

Enfin la méthode la plus utilisée actuellement est la technique ELISA dont :

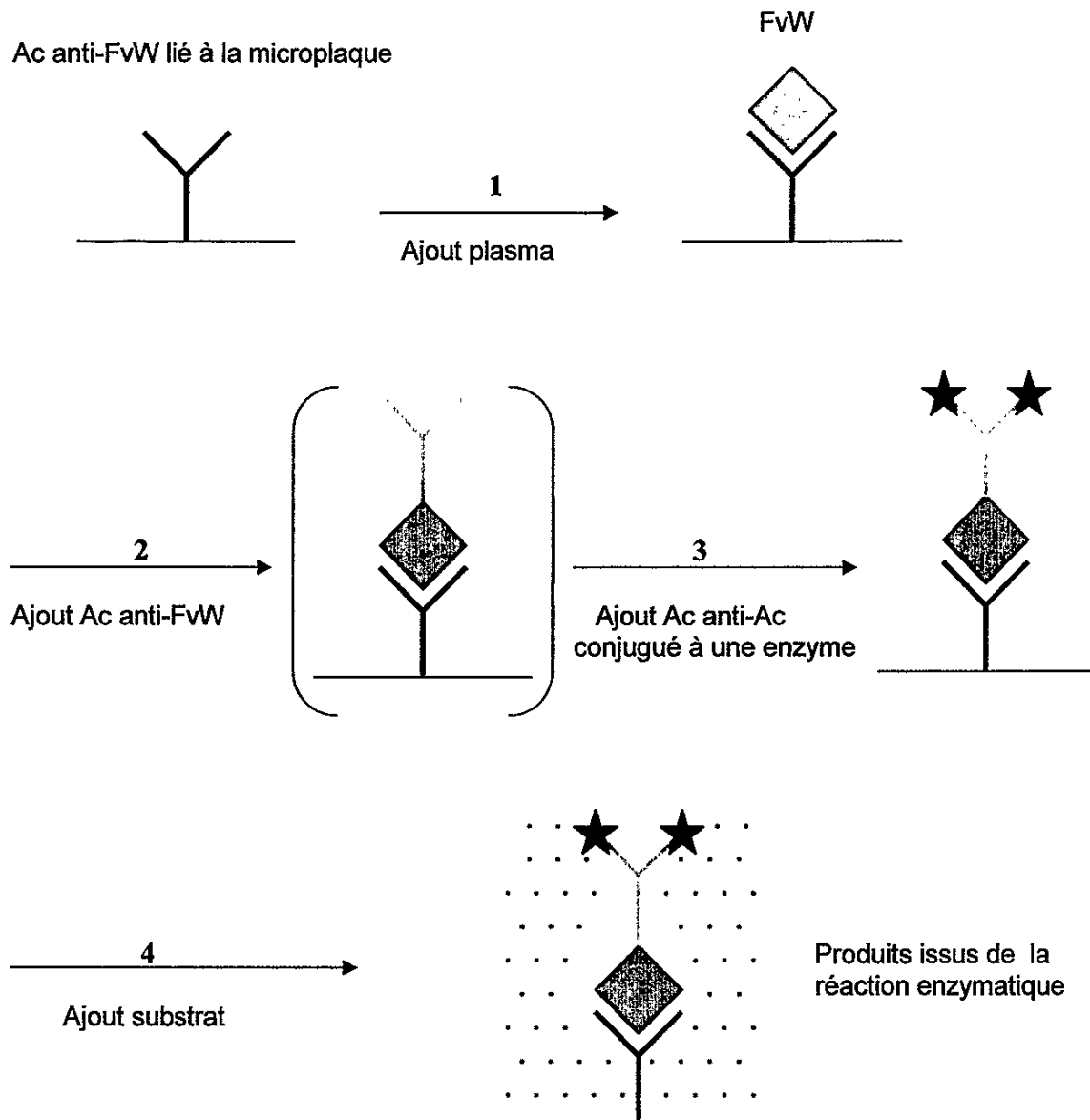
- la sensibilité est supérieure à l'immunoélectrophorèse,
- les résultats sont corrélés avec l'immunoélectrophorèse sauf pour les valeurs extrêmes où les valeurs basses sont majorées et les valeurs hautes minorées,
- les réactifs sont facilement disponibles et bon marché,
- la reproductibilité est correcte,
- il existe un test validé chez le Chien [16].

La technique ELISA direct présente plusieurs étapes :

- un anticorps anti-vWF:Ag est liée à une microplaque,
- le plasma à tester est disposé sur la microplaque et le vWF se lie sur l'anticorps,
- on ajoute alors un nouvel anticorps anti-vWF qui se lie au complexe précédemment formé,
- un anticorps de détection marqué avec une enzyme est fixé sur le complexe,
- l'ajout du substrat permet par réaction enzymatique de mesurer la concentration en facteur de von Willebrand. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la concentration obtenue à partir de plasmas de référence (dont la valeur est arbitrairement définie comme étant égale à 100 %) (Figure 16).

Figure 16. Présentation des divers étapes du dosage du facteur de von Willebrand:Ag

par technique ELISA d'après [21]



Légende : l'anticorps anti-facteur de von Willebrand (Ac anti-FvW) est représenté par un Y. On lui ajoute le plasma dans lequel est contenu le facteur de von Willebrand (FvW) représenté par un losange. L'enzyme couplée à l'anticorps anti-anticorps (Ac anti-Ac) est elle représentée par une Y surmonté de deux étoiles.

L'interprétation des valeurs se fait en fonction de certains intervalles couramment utilisés. Ainsi on déterminera que le sujet est déficient en vWF si les valeurs sont comprises entre 0 et 49 %, et que le

test est équivoque si ces valeurs sont comprises entre 50 et 69 %. Lors de résultats équivoques il est parfois nécessaire de refaire le test. Ces résultats sont bien évidemment à coupler avec l'anamnèse et les signes cliniques [16].

b. Mesure de l'activité du vWF vis-à-vis de l'agglutination et de l'agrégation plaquettaire [16].

Une fois le dosage quantitatif effectué, il est intéressant de faire une mesure de l'activité du vWF lors de suspicion de déficit de l'hémostase primaire. Pour cela un test permettant d'estimer la capacité de ce facteur à jouer son rôle de cofacteur de l'agglutination et de l'agrégation plaquettaire a été développé. Pour cela, chez l'Homme, on utilise une substance, la ristocétine. *In vitro* le vWF ne réagit pas spontanément avec les plaquettes. L'intervention d'un modulateur exogène, la ristocétine, un antibiotique glycopeptidique, induit un changement de conformation du vWF, conduisant à une agglutination des plaquettes. En pratique, le plasma à tester est mis en présence de plaquettes préalablement lavées et fixées à l'aide de formol ; suite à l'ajout de ristocétine, la mesure de l'agglutination plaquettaire, appelée dans ce cas mesure de l'activité cofacteur de la ristocétine, est réalisée de visu ou à l'aide d'un agrégomètre. La vitesse de formation de l'agrégat est comparée avec celles obtenues pour des animaux sains. Le résultat est exprimé en pourcentage (100 % = valeur du plasma d'individu normal).

Chez le Chien, on emploie maintenant de la botrocétine. Des études ont montré que de nombreux venins de serpent, notamment de l'espèce *Bothrops jararaca* (une vipère d'Amérique du Sud) sont à l'origine d'une coagulation sanguine majeure sauf en l'absence de facteur de von Willebrand [16]. Ce test consiste donc à vérifier la présence d'une agglutination plaquettaire en présence de ce venin selon un test identique à celui à la ristocétine.

Enfin il existe un test au polybrène (bromide de hexasémine) qui utilise le même principe que le test précédent pour mesurer l'activité du facteur de von Willebrand chez l'Homme [92].

Une diminution de l'activité de cofacteur de la ristocétine est significative d'une maladie de von Willebrand chez le Chien. Cette technique présente l'avantage d'être rapide et facile à mettre en œuvre, mais la standardisation des résultats est difficile et la méthode visuelle peu précise.

c. Etude de la distribution des multimères

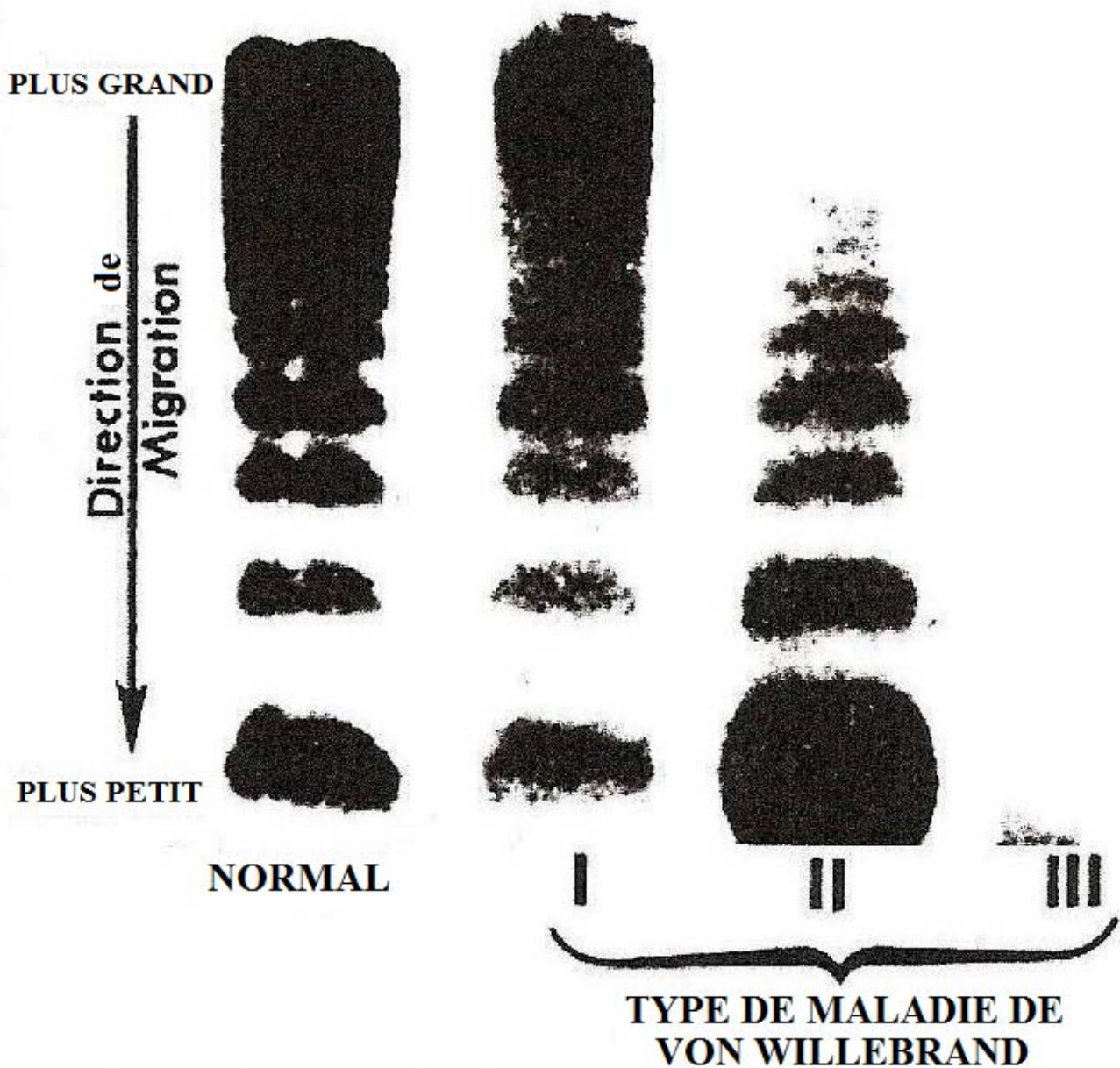
La distribution des multimères est utilisée pour différencier les différents types de maladie de von Willebrand notamment pour le type 2. L'étude de la répartition des multimères plasmatiques est une technique qui fait appel à l'immunoélectrophorèse croisée ou à une analyse multimérique [112]. Ces deux méthodes ne sont pas disponibles en pratique courante en médecine vétérinaire.

L'immunoélectrophorèse croisée donne des arcs de précipitation dont la forme est un facteur qui permet de déterminer la fréquence relative des divers multimères en fonction de leur taille. Quant à l'analyse multimérique, c'est la technique la plus utilisée actuellement. Elle consiste en une électrophorèse en gel d'agarose (obtention d'une meilleure résolution) suivie par une autoradiographie [112]. Une technique dérivée, de réalisation plus simple, associe une électrophorèse et une utilisation d'anticorps anti-vWF:Ag marqués, puis une révélation par une technique immunoenzymatique [16].

Chez un individu normal, on obtient une hétérogénéité des multimères, avec notamment une microhétérogénéité due au clivage protéolytique des sous-unités, et qui a pour conséquence que chaque multimère est représenté par plusieurs bandes. En fonction des types de maladie de von Willebrand on obtient une distribution variable (Figure 17) :

- Type 1 : le spectre de bande est normal mais les bandes sont d'intensité plus faible (déficit quantitatif en facteur de von Willebrand),
- Type 2 : le spectre est anormal avec une quasi-absence de bandes correspondant aux multimères de haut poids moléculaire,
- Type 3 : le spectre de bande est impossible à observer (quasi-absence de multimères) [16].

Figure 17. Analyse de la distribution des multimères du facteur de von Willebrand [21]



Légende : la figure présente la distribution des multimères du facteur de von Willebrand en fonction de leur migration (poids le plus léger en haut de la figure) pour un chien normal (« normal ») et pour chacun des types de la maladie de von Willebrand (I, II et III).

d. Tests génétiques

Les tests génétiques seront étudiés lors de l'étude de la maladie de von Willebrand.

2. Test de la fonction plaquettaire

Les tests de la fonction plaquettaire sont à mettre en place dans le diagnostic des thrombopathies, c'est-à-dire des altérations de la fonction thrombocytaire. Les thrombopathies sont à suspecter chez tout animal présentant un allongement du temps de saignement avec une numération plaquettaire, des tests de la coagulation et un dosage du vWF:Ag normaux.

En médecine vétérinaire, ces tests ne sont pas accessibles en pratique et ne sont utilisés qu'en recherche. Cependant un analyseur des fonctions plaquettaires (PFA-100[®], laboratoire Dade-Behring) pourrait dans l'avenir permettre une exploration plus aisée de ces fonctions (www.dadebehring.com).

a. Test d'adhésivité

In vivo, le test de Borchgrevink consiste à pratiquer une incision identique à celle pratiquée dans la méthode d'Ivy et à dénombrer le nombre de plaquettes 6 minutes plus tard, à la fois au niveau de l'incision mais aussi au niveau du sang veineux périphérique.

Lorsque l'adhésivité est correcte, 40 à 50 % des plaquettes ont adhéré à la brèche vasculaire [92].

Il existe également des tests *in vitro*. Les tests de Salzman ou Hellem consistent à dénombrer les thrombocytes avant et après le passage d'un volume standard de sang au travers d'une colonne plastique recouverte de billes de verre. La rétention plaquettaire dans le tube dépend de la concentration en facteur de von Willebrand et de la fonction plaquettaire. L'inconvénient de ces méthodes tient au fait que les conditions sont loin d'être identiques aux conditions physiologiques et par conséquent leurs interprétation est difficile [16].

b. Test d'agrégation

Ces tests sont de pratique courante en médecine humaine lors de suspicion de thrombopathie congénitale ou acquise. Malheureusement leur utilisation reste du domaine expérimental en médecine vétérinaire eu égard à leur coût important.

α. Principe

Les mesures de l'agrégation plaquettaire sont réalisées à l'aide d'un agrégomètre. Ce type d'appareil existe selon deux types :

- les agrégomètres à impédance (correspond pour le courant alternatif à la résistance pour les courants continus),
- les agrégomètres optiques.

➤ Agrégomètre à impédance

Dans la méthode à impédance, les échantillons sanguins sont dilués en présence d'une solution saline ou tamponnée. L'agrégation plaquettaire est alors détectée par la mesure de l'impédance électrique entre deux électrodes immergées dans l'échantillon. Une gamme étalon doit au préalable être réalisée avec des électrodes recouvertes d'une monocouche de plaquettes. On ajoute alors un agoniste dont le rôle est de permettre l'agrégation. L'accumulation de plaquettes sur les électrodes diminue alors l'impédance entre celles-ci. L'agrégation plaquettaire est par conséquent mesurée par des variations d'ohms. Cette méthode est longue à réaliser, mais sa sensibilité est très forte et permet de mettre en évidence des petites variations d'impédance si toutefois l'agrégation n'est pas masquée par des doses trop importantes d'agonistes [92].

➤ Agrégomètre optique

Cette méthode est fondée sur les variations en lumière de transmission d'un plasma riche en plaquettes (PRP). L'agrégation est alors mesurée par des techniques de turbidimétrie.

Une cuvette contenant un nombre défini de plaquettes en suspension dans un PRP est traversée par un rayon de lumière. La majeure partie de la lumière est réfléchi à la source mais une partie parvient à un détecteur de lumière après avoir traversé la solution. Une cuvette contenant un plasma pauvre en plaquettes sert de référence pour une transmission de la lumière de 100 %. La transmission initiale des plaquettes est mesurée (agrégation égale à 0 %) pendant 1 minute afin de

supprimer la diminution de la transmission due à la suspension de particules discoïdes en mouvement. Un agoniste est ensuite ajouté dans la cuve ; les plaquettes deviennent alors sphériques par changement de conformation. Les plaquettes sphériques arrêtant plus de lumière, il y en a moins qui arrive jusqu'au détecteur. Aussi l'agrégation se traduit comme une diminution de la transmission jusqu'à atteindre un plateau qui permet de calculer le taux et l'importance maximale de l'agrégation [92].

β. Interprétation [16]

La thrombine et le collagène induisent une agrégation rapide et irréversible des plaquettes chez tous les Mammifères, à la différence des autres agonistes dont l'agrégation est variable. Par conséquent ces deux molécules ne seront pas utilisées.

L'ADP conduit également à une agrégation irréversible suite à la sécrétion d'ADP par les granules denses ce qui amplifie l'agrégation. La sérotonine induit chez le Chien, un changement de conformation des thrombocytes, alors que chez l'Homme elle induit une faible agrégation. Quant à l'épinéphrine, elle entraîne chez ces deux espèces une agrégation moyenne. Toutefois en présence d'autres agonistes, ces deux molécules ont une action synergique responsable d'une agrégation importante. Le PAF et le thromboxane A2 produisent des réponses variables en fonction de l'espèce étudiée. Ainsi les plaquettes canines sont plus sensibles au PAF mais moins au thromboxane A2 que les plaquettes humaines.

Ces différences existant entre les divers agonistes sont utilisées pour l'exploration fonctionnelle de l'hémostase primaire mais *in vivo* elles n'ont que peu d'importance car tous les agonistes interviennent en même temps.

Les défauts d'agrégation ainsi mis en évidence sont présents dans toutes les thrombopathies excepté celles avec défauts d'activité procoagulante plaquettaire. L'utilisation de divers agonistes permet de faire la différence entre défauts de changement de conformation, de reconnaissance et/ou de transduction du signal, d'adhésion ou encore de *release* plaquettaire.

c. Test de *release* (sécrétion) plaquettaire [16]

Les mesures sont réalisées à l'aide d'agrégomètres spéciaux (luminagrégomètre) capables de mesurer la luminescence d'un signal. Ces appareils sont ainsi capables de mesurer simultanément l'agrégation et le « *release* » (sécrétion) plaquettaire, grâce à un enregistrement du signal de luminescence généré par l'exocytose des granules denses. L'évaluation est permise par la quantité de sérotonine marquée au carbone 14 ou d'ATP libérée.

Un défaut de *release* plaquettaire est du à une anomalie de liaison, de stockage, de métabolisme ou d'exocytose des granules denses. Le ratio ATP/ADP permet d'identifier les défauts de stockage.

d. Etude des glycoprotéines membranaires

Ils existent diverses méthodes pour étudier les types et les quantités des glycoprotéines membranaires. Auparavant, les différentes fractions glucidiques et protéiques étaient isolées par électrophorèse sur gel. Aujourd'hui des techniques immunologiques fondées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux permettent de mesurer plus précisément le type et la quantité des glycoprotéines de surface des plaquettes, notamment par cytométrie de flux ou immunoblot [16].

e. Etude de l'activité procoagulante plaquettaire

L'activité procoagulante plaquettaire est encore peu étudiée en médecine vétérinaire. Elle peut néanmoins être mesurée à l'aide du test à la prothrombinase ou alors par cytométrie de flux [16].

3. Tests génétiques

Les tests génétiques réalisables, lorsqu'ils existent chez le Chien et le Chat, seront vus lors de l'étude des diverses maladies héréditaires.

II. EXPLORATION DE LA COAGULATION

A. EXPLORATION GLOBALE

1. Temps de coagulation du sang total : technique de Lee et White [92]

Il s'agit de mesurer le temps de coagulation d'un échantillon de sang prélevé sans anticoagulant lorsque celui-ci est placé dans un tube en verre aux parois lisses sans silicone. Il est important pour estimer correctement le temps de coagulation d'utiliser des seringues chimiquement propres et sèches, des tubes à hémolyses propres, secs et préalablement rincés à l'aide d'une solution saline. La ponction veineuse doit, comme pour toutes les autres mesures de la coagulation, se faire facilement et directement dans le vaisseau afin de limiter les lésions tissulaires qui augmentent le taux de facteur tissulaire (facteur III) dans l'échantillon. Il convient enfin de limiter la présence de bulles d'air dans la seringue lors du prélèvement.

Dans la technique de Lee et White, un échantillon de 3 mL de sang est prélevé à l'aide d'une seringue rincée auparavant à l'aide d'une solution saline. Trois tubes de test sont alors remplis chacun avec 1 mL et sont maintenus 3 minutes dans un bain dont la température est comprise entre 25 et 37°C. On retourne alors les tubes toutes les 30 secondes ; on considère que le caillot est formé quand le tube peut être retourné sans que le sang ne tombe par gravité. La moyenne des résultats obtenus pour les 3 tubes donne le temps de coagulation.

Le temps de coagulation chez un chien normal est compris entre 3 et 13 minutes pour une température de 37°C ; cette valeur est d'environ 8 minutes chez le Chat. Attention néanmoins à ne pas agiter de manière trop énergique le tube ce qui limite la formation du caillot [92].

La mesure du temps de coagulation permet une étude facilement réalisable mais très peu sensible de l'activité coagulatoire ; en effet, un allongement du temps de coagulation ne s'observe que lorsque l'activité d'un facteur de la coagulation est inférieure à 5 % de l'activité normale. Par conséquent un temps de saignement normal ne permet pas de conclure à une absence de déficit de l'un des facteurs de la coagulation [92].

2. Temps de coagulation en tube ou méthode de Hayem

Le sang collecté est placé dans un tube de 5 cm de long et de 1 mm de diamètre rempli au trois quarts de sa longueur. Le tube est retourné jusqu'à ce que le flot de sang cesse. Le tube est ensuite

cassé petit bout par petit bout toutes les 30 secondes jusqu'à ce que la fibrine forme des filaments entre le tube et le fragment.

Les temps obtenus chez le Chien et le Chat sont identiques à celles obtenues par la technique de Lee et White [100].

3. Temps de Howell ou temps de recalcification plasmatique

On recueille le plasma de l'animal à tester après centrifugation de l'échantillon sanguin, lui-même recueilli sur un tube citraté, à 1000 tours / minute pendant 5 minutes. Ce plasma est ensuite recalcifié à l'aide d'une solution calcique. On mesure alors à 37°C, le temps de coagulation du plasma à partir de l'ajout de la solution calcique.

Le temps de Howell chez un chien normal est compris entre 45 secondes et 1 minutes 15 mais ce test reste peu sensible [90]. Il permet toutefois d'évaluer globalement la coagulation et tout déficit d'un des facteurs de la coagulation amènera un allongement du temps de Howell.

En médecine humaine, il n'est plus de nos jours utilisé en France [90].

B. EXPLORATION DES DIFFÉRENTES VOIES

1. Temps de Quick

a. Principe

Le temps de Quick correspond à la mesure du temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes, recalcifié en présence d'un excès de thromboplastine tissulaire [90]. L'ajout du facteur III permet l'activation du facteur VII et par conséquent de la voie extrinsèque puis de la voie commune.

La réalisation du test nécessite que 9 unités de sang de l'animal à tester soient mélangées à une unité d'une solution de citrate de sodium à 3,2 % [162]. Le plasma est récupéré après centrifugation à 4 000 tours / minute pendant 5 minutes ; il est alors pauvre en plaquettes. Un dixième de millilitre de plasma est alors ajouté dans un tube de test placé à 37°C pendant 1 minute. La solution de facteur tissulaire contient un mélange égal de thromboplastine de lapin et de CaCl₂

(0,22 g de CaCl₂ mélangé à de l'eau distillée). Le réactif contient en plus du polybrène (inhibiteur de l'héparine) ce qui explique que le temps de Quick ne soit pas allongé lors d'une utilisation de l'héparine à des doses pharmacologiques. Après avoir été réchauffée à 37°C, 0,2 mL de la solution est incorporé énergiquement avec le plasma à tester. Le chronomètre est déclenché à ce moment là. Le tube est maintenu à 37°C et est secoué lentement jusqu'à la formation d'un caillot visible [92]. Avec la thromboplastine de lapin, le temps de Quick d'un chien ou d'un chat sain est compris entre 6 et 7 secondes.

Une thromboplastine recombinante peut aussi être utilisée ; les valeurs diffèrent alors des valeurs obtenues avec la thromboplastine de lapin. Il est donc difficile de donner des valeurs de référence car les temps obtenus dépendent de la thromboplastine utilisée [90].

Pour limiter les variations du plasma à tester en facteur V instable et en fibrinogène, l'addition de sulfate de baryum permet de rendre les derniers kits de test insensible à ses variations [92].

b. Interprétation

Le temps de Quick permet l'exploration de la voie extrinsèque et de la voie commune c'est-à-dire qu'il est sensible à la diminution des facteurs I, II, V, VII et X. L'héparine modifie peu les résultats du temps de Quick.

Aussi le temps de Quick est fortement augmenté lors de déficit congénital dans un des facteurs de coagulation qui compose la voie extrinsèque ou la voie commune. Un déficit en vitamine K augmente aussi le temps de Quick.

Le temps de Quick est exprimé en secondes par rapport au temps d'un témoin. Les mesures du test peuvent également être exprimées en pourcentage par rapport à la normale ; on parle alors de taux de prothrombine. La conversion entre les deux façons d'exprimer le résultat se fait à l'aide d'une droite dite de « Thivolle » [92].

Il existe toutefois des erreurs provoquant un allongement artificiel du temps de Quick [92] :

- un mélange dénaturé par des températures employées trop importantes,
- une thromboplastine trop peu active ; ainsi si pour un chien normal, le temps de Quick est supérieur à 16 secondes, il devient difficile d'obtenir des résultats précis,
- sur un plasma trop vieux (plus de 6 heures) ou conservé à une température trop élevée (le facteur V est thermolabile) ou sur un plasma pauvre en fibrinogène,

- des erreurs de lecture notamment lorsque l'agitation du tube est trop brutale empêche l'apparition du caillot.

L'utilisation de thromboplastines différentes ne permet pas de donner de valeurs de référence [90].

2. Temps de céphaline activée ou temps de thrombine partiellement activée

a. Principe

L'échantillon sanguin prélevé sur l'animal à tester est préalablement centrifugé de manière à obtenir un plasma pauvre en plaquettes. A une température de 37°C, on ajoute alors à ce plasma un mélange de CaCl₂ pour recalcifier le mélange, de céphalines et d'un agent activateur du système contact.

Les céphalines sont des phospholipides du cerveau qui possèdent une action procoagulante similaire à celle des plaquettes. Ils activent ainsi la voie intrinsèque de la coagulation. Un activateur du système contact (facteur XI et XII) est aussi ajouté à la solution à tester. Le kaolin (activateur particulaire) est l'une des molécules les plus couramment utilisées mais on peut citer également l'acide ellagique ou la silice (activateur soluble) qui, d'après certaines études, seraient moins sensibles que le kaolin (non confirmé par l'étude de Mischke en 2000 [160]). Le type de céphalines utilisées jouerait également un rôle dans la sensibilité du test. Ces céphalines peuvent provenir de placenta humain ou de cerveaux de lapin. Des phosphatides provenant de soja sont utilisés parfois pour jouer le rôle de céphalines [92].

Les valeurs obtenues pour un chien normal dépendent du test utilisé [90].

b. Interprétation

Le temps de céphaline activée permet l'étude des voies intrinsèque et commune de la coagulation plasmatique ; interviennent dans ces voies les facteurs II, V, VIII:C, IX, X, XI et XII mais aussi la prékallitréine et le kininogène de haut poids moléculaire. Ainsi un allongement du temps de thrombine partiellement activée est significatif d'un déficit de l'un des éléments précédemment cités. En cas de déficit en vitamine K, ce temps sera aussi augmenté.

Les valeurs obtenues par ce test ne sont pas parfaitement reproductibles, il est donc important de toujours comparer les valeurs de l'animal à tester à celles d'un animal sain [82, 90]. On considérera

alors que le temps de céphaline activée est allongé si le rapport plasma à tester / plasma animal sain est supérieur à 1,3. Bay et collaborateurs ont néanmoins proposé des valeurs de référence chez le chat [6].

Un stockage de 48 à 72 heures du plasma au réfrigérateur modifie les valeurs du test [78].

3. Temps de thrombine [90]

Il s'agit du temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes en présence de thrombine. Ce test explore la fibrino-formation ; il est par conséquent sensible au taux de fibrinogène, au dysfibrinogénémie et à la présence d'inhibiteurs de la thrombine tels que l'héparine, les PDF ou les anticorps anti-thrombine. Par contre il est insensible au facteur XIII.

Un temps de thrombine d'un animal normal doit être inférieur au temps du témoin (animal sain pris au hasard) plus 6 secondes.

4. Temps de reptilase [92]

Il s'agit du temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté pauvre en plaquettes en présence de reptilase. La reptilase est une enzyme extraite du venin de vipère *Bothrops atrox* et qui est capable de transformer directement le fibrinogène en fibrine.

Ce test est sensible aux mêmes paramètres que le temps de thrombine mais il est insensible à l'héparine. Toutefois de nos jours il n'est plus que rarement utilisé.

5. Temps de venin de vipère Russel dilué (dRVVT) [92]

C'est le temps de coagulation en présence de phospholipides dilués, d'un activateur du facteur X et d'une endopeptidase de venin de vipère. Ce test évalue la transformation de la prothrombine en thrombine par le facteur Xa, le facteur V et les phospholipides. Il permet d'explorer la voie commune de la coagulation sans réagir à la voie extrinsèque ou intrinsèque.

Chez l'Homme, le test est positif (en cas de défaut de coagulation) si le temps du malade moins le temps du témoin est supérieur à 6 secondes ou si le rapport des deux temps est supérieur à 0,5.

C. EXPLORATION DES FACTEURS DE LA COAGULATION

L'exploration spécifique de chaque facteur de la coagulation sera étudiée en même temps que les maladies associées à leur déficit.

Une étude de Furlanello et collaborateurs, en 2006, a montré que le stockage à température ambiante de plasma canin pendant 2 jours n'a aucun effet sur les tests de l'hémostase si ce n'est une diminution de la concentration en fibrinogène. Par contre la conservation du plasma au réfrigérateur rend les facteurs VIII, IX et XI instables après 48 à 72 heures [80].

D. EXPLORATION DES INHIBITEURS DE LA COAGULATION [92]

1. Dosage des inhibiteurs des sérines protéases

a. Dosage de l'antithrombine III

L'antithrombine III de l'échantillon à tester est transformée en inhibiteur de la thrombine par l'ajout d'héparine. En utilisant un milieu dans lequel la quantité de thrombine est connue, la détermination de la quantité résiduelle de thrombine permet de connaître le taux d'antithrombine III. Pour cela on utilise un substrat chromogène dont l'action de la thrombine va modifier la densité optique (voir dosage de l'antiplasmine au paragraphe IIIB3).

b. Dosage de l'inhibiteur de la C'1 estérase

On utilise pour ce dosage un réactif au sein duquel est présent une quantité excessive et connue de la C'1 estérase. L'inhibiteur de la C'1 estérase inhibe la C'1 estérase présente dans le réactif. Une méthode cinétique permet alors de déterminer la quantité résiduelle de C'1 estérase (mesure de variation de densité optique d'un substrat à base de PNA (ParaNitroAniline) (voir dosage du plasminogène au paragraphe IIIB1).

c. Dosage du cofacteur II de l'héparine

En présence de dermatane sulfate qui est son activateur spécifique ou de fortes doses d'héparine, le cofacteur II de l'héparine exerce un rôle antithrombinique majeur. Son action est spécifiquement dirigée vers la thrombine avec laquelle il forme un complexe équimoléculaire inactif.

Pour le dosage on utilise un plasma enrichi par une quantité connue de thrombine. Une fois le plasma testé ajouté il suffit de mesurer la quantité de thrombine résiduelle par son action sur les PNA du substrat chromogène (voir dosage du plasminogène au paragraphe IIIB1). Connaissant les quantités initiales et résiduelles de thrombine, il suffit d'en déduire la quantité de cofacteur II de l'héparine.

2. Système de la protéine C

a. Dosage de la protéine C

En présence d'un activateur spécifique (protéine hautement purifiée provenant du venin de la vipère *Agkistrodon contortrix*), la protéine C devient activée. Elle est ainsi apte à dégrader les facteurs V et VIII. Le temps de coagulation est par voie de conséquence prolongé.

En pratique, on mélange le plasma à tester avec un plasma déficient en protéine C et l'activateur de la protéine C pendant 3 minutes à 37°C puis on ajoute du CaCl₂ et on déclenche la mesure du temps de coagulation. L'activité de la protéine C du plasma à tester est comparée à des plasmas témoin ce qui permet l'obtention d'un pourcentage d'activité.

Il existe une méthode colorimétrique permettant de mesurer la quantité de protéine C. Cette technique utilise un substrat chromogène à base de groupements de PNA (voir dosage du plasminogène au paragraphe IIIB1).

b. Dosage de la protéine S

Le principe du dosage de la protéine S repose sur son activité de cofacteur potentialisant l'effet anticoagulateur de la protéine C activée, que l'on peut objectiver par l'allongement du temps de coagulation d'un système enrichi en facteur V. Ainsi en pratique pour mesurer l'activité de la protéine S, le plasma à tester sera mis en présence d'un mélange comprenant un plasma dépourvu de protéine S (plasma humain), de protéine C activée (humaine également) et de facteur V (bovin). Le temps de coagulation est alors mesuré à partir de l'ajout de CaCl_2 à la solution. On obtient alors un pourcentage d'activité de la protéine S.



MCours.com