

III. EXPLORATION DE LA FIBRINOLYSE

A. EXPLORATION GLOBALE : TEMPS DE LYSE DES EUGLOBULINES OU TEST DE VON KAULLA

L'exploration fonctionnelle de la fibrinolyse est réalisée grâce à la mesure du temps de lyse des euglobulines (nom donné au groupe des protéines activatrices de la fibrinolyse) ou test de von Kaulla. Il consiste à faire précipiter en milieu acide les euglobulines (fibrinogène, activateur du plasminogène, une partie du PAI-1), ce qui laisse dans le surnageant la majorité des inhibiteurs de la lyse du caillot. On mesure alors la vitesse de lyse du caillot après activation de la coagulation [154]. Pour cela le prélèvement sanguin à tester est recueilli sur un tube citraté. A une température de 4°C, on ajoute de l'acide acétique ce qui provoque la précipitation des euglobulines. Après centrifugation le précipitat est dissous dans un milieu tampon à 37°C. L'ajout de CaCl₂ déclenche la coagulation ce qui conduit à la formation d'un caillot de fibrine. On mesure alors le temps de lyse du caillot c'est-à-dire en pratique le temps que met le milieu gélifié à se liquéfier.

Sur un prélèvement provenant d'un chien ne présentant pas de troubles de la fibrinolyse, le caillot est dégradé rapidement en l'absence des inhibiteurs de la fibrinolyse. Ainsi les valeurs seront comprises entre 50 et 190 minutes chez le Chien (supérieure à 3 heures chez l'Homme). Un temps inférieur à ces valeurs traduit une hyperfibrinolyse [92]. Aucune donnée sur le Chat n'a été retrouvé durant nos recherches.

Autrefois était utilisée la méthode de lyse d'un caillot de sang total mais la durée de la mesure (supérieure à 72 heures) était très longue et cette technique est donc complètement abandonnée aujourd'hui.

B. TESTS ANALYTIQUES

1. Dosage du plasminogène

a. Dosage fonctionnel

Le plasminogène est dosé par une méthode amidolytique sur un substrat synthétique. Le substrat est constitué d'oligopeptides chromogènes : les groupements paranitroaniline (PNA). Ce substrat libère des PNA par coupure enzymatique notamment par l'action de la plasmine.

La première étape du test consiste à mettre en présence du plasma dilué à tester un excès d'activateur, la streptokinase. Il se forme alors un complexe streptokinase-plasminogène qui possède une action plasmine-like. La solution est alors placée sur le substrat où le complexe ainsi formé va lyser les groupements de PNA. La libération de PNA est alors mesurée à une longueur d'onde de 405 nm par la différence de densité optique induite [182].

Les valeurs obtenues sont comparées au plasma témoin et le taux d'activité du plasminogène est obtenu en pourcentage.

b. Dosage immunologique

Le dosage immunologique du plasminogène est effectué à l'aide d'un antisérum soit par immunodiffusion radiale (technique de Mancini) soit par immunoélectrodifffusion (technique de Laurell) [92].

2. Dosage de t-PA, de l'urokinase et du PAI-1

Les dosages du t-PA, de l'urokinase et du PAI-1 sont réalisés par la technique ELISA. Ces tests ne sont jamais réalisés en routine en médecine vétérinaire [92].

3. Dosage de l' α 2-antiplasmine

Il s'agit d'un dosage semi-quantitatif par une méthode amidolytique sur un substrat chromogène. Le plasma à tester est incubé en présence de plasmine en excès mais de quantité connue. Il se forme alors un complexe α 2-antiplasmine/plasmine dont la limitante est la quantité d' α 2-antiplasmine [182]. Il suffit alors de mesurer la plasmine résiduelle par son activité amidolytique sur le substrat, à l'aide de la mesure de libération des PAN. Connaissant la quantité de plasmine initiale et la quantité résiduelle, il devient alors aisé de déterminer la quantité d' α 2-antiplasmine du patient [92].

C. TESTS INDIRECTS

1. Dosage du fibrinogène

a. Dosage chronométrique dit de von Clauss

La méthode de von Clauss est une méthode utilisant la thrombine pour la détermination quantitative du fibrinogène plasmatique. Cette technique est dérivée du temps de thrombine. En pratique on mesure le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté dilué pauvre en plaquettes en présence de calcium et de thrombine. En présence d'un excès de thrombine, Clauss a remarqué que le temps de coagulation du plasma est proportionnel à la concentration en fibrinogène. Ainsi une droite de calibration doit être réalisée à partir de plasma témoin titré en fibrinogène. Le taux plasmatique normal du fibrinogène est compris entre 2 et 4 g/L chez le Chien et le Chat. Ce test est néanmoins sensible aux fortes doses d'héparine [100].

b. Dosage immunologique

Il s'agit d'un dosage quantitatif du fibrinogène utilisant différentes techniques et notamment la méthode de Mancini. Le plasma à tester et l'immunoglobuline spécifique sont déposés dans deux puits différents disposés dans un gel. La diffusion dans le gel des deux molécules les amène à se rencontrer et à former un précipité qui prend alors la forme d'un arc de cercle. La mesure de l'arc de cercle permet de déduire la quantité de fibrinogène [100].

2. Dosage des produits de dégradation de la fibrine (PDF)

Toutes les méthodes de dosage des produits de dégradation de la fibrine dans le plasma sont fondées sur la reconnaissance immunologique des fragments peptidiques. Actuellement les seuls anticorps anti-PDF qui sont disponibles sont des anticorps humains ; par conséquent il convient de vérifier que ces anticorps ont bien une réaction croisée avec les anticorps de l'espèce à tester. Ce problème rend difficile l'interprétation des résultats en médecine vétérinaire. La technique utilisée actuellement est une méthode par agglutination de particules de latex sensibilisées avec des

anticorps anti-PDF. Normalement la quantité de PDF dans le sang est inférieure à 10 µg/mL chez les carnivores domestiques [154].

3. Dosage des D-dimères

Les D-dimères sont des produits de la dégradation de la fibrine qui apparaisse lors de toute activation de cette dernière. Leur dosage présente uniquement un intérêt lors de recherche de maladie thromboembolique veineuse en médecine humaine et n'est pas utilisé en médecine vétérinaire. Le dosage est le plus généralement réalisé grâce à la technique ELISA [182].

Le perfectionnement des méthodes d'exploration permet aujourd'hui d'étudier d'une manière de plus en plus fine les troubles de l'hémostase. Ces améliorations ont notamment permis une meilleure compréhension des divers troubles héréditaires de l'hémostase qui seront maintenant étudiés.



MCours.com