

Année 2009



**LES TROUBLES HÉRÉDITAIRES DE
L'HÉMOSTASE CHEZ LES CARNIVORES
DOMESTIQUES**

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

le

par

Samuel LEGRU

Né le 25 avril 1984 à Lens (Pas-de-Calais)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Mme BERNEX Florence

Maître de conférences, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : Mlle ABITBOL Marie

Maître de conférences, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Professeurs honoraires: MM. BRUGERE Henri, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques,

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henry, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE , MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE Mme COMBRISSEON Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur M. TISSIER Renaud, Maître de conférences* M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p> <p>- DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p>	<p>- UNITE D'HISTOLOGIE , ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur* Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur* Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences* M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE M. PHILIPS, Professeur certifié</p>
--	---

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Maître de conférences

<p>- UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences* Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences* M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)</p> <p>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme Françoise ROUX, Maître de conférences contractuel</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur* M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences contractuel M. JARDEL Nicolas, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier</p> <p>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur* M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences Mme HALOS Lénaïg, Maître de conférences M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier</p> <p>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur M. GRANDJEAN Dominique, Professeur</p>
--	--

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOR Barbara, Maître de conférences

<p>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Maître de conférences Mme DUFOR Barbara, Maître de conférences</p> <p>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences* M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : BIostatISTIQUES M. SANAA Moez, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTIER Andrew, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences*</p>
--	---

* Responsable de l'Unité

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur,

Professeur à la faculté de Médecine de Créteil,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommage respectueux.

A Madame BERNEX,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui nous a fait l'honneur de diriger et corriger ce travail,

Qu'elle trouve ici l'expression de notre reconnaissance et notre profond respect.

A Mademoiselle ABITBOL,

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être assesseur,

Pour l'attention qu'elle a portée à l'examen de ce travail,

Qu'elle trouve ici l'expression de nos sincères remerciements.

A Claire, mon piti poulet pour tout ce que tu m'apportes,

A mes parents,

A Séverine, sois heureuse avec Mickael pendant encore longtemps,

A mes grands-parents, vous me manquez,

A Jean-Luc, mon parrain,

A mon ancienne Emilie, qui m'a fait faire mes premiers pas à l'ENVA,

Au groupe 1, le premier à tous les niveaux. Merci à Adèle, Erwan, Julie C., Julie D., Laurence, Thomas et Valérie. Un merci plus particulier au plus grand d'entre eux, Thibault, martyr du groupe à ces heures dont la gaieté a éclairé nos années, encore merci !,

A la promo 2008 et plus particulièrement à Alex, Mimic, Jean-Phi, Flo, Lucie, Thomas, Milie, Eve et Ducru. Merci pour votre amitié et tous ces moments qui resteront, à jamais, gravés dans ma mémoire,

A mes poulottes,

A tous ceux avec qui j'ai passé de bons moments à l'Ecole notamment à l'EDHEC ou au hand,

A M. Bersoux, professeur au grand cœur,

Un grand merci aux docteurs Hannotte, Gabriel's, Kieffer, Locci, Gnirs, Quinton, Prélaud et Hennem qui m'ont fait découvrir et apprécier le métier de vétérinaire,

Au personnel de la clinique de la rue Paul Bert, pour leur accueil et pour le futur,

A tous ceux que j'ai oubliés,

TABLE DES MATIERES

FIGURES.....	14
TABLEAUX.....	18
ABREVIATIONS.....	20
INTRODUCTION.....	24
pREMIERE PARTIE :.....	25
physiologie de l'hémostase.....	25
III.L'hémostase primaire.....	26
A.Eléments intervenant dans l'hémostase primaire.....	28
1.Cellules endothéliales.....	28
a.Prostacycline.....	28
b.Monoxyde d'azote.....	28
c.Autres rôles.....	29
2.Plaquettes.....	29
a.Origine.....	29
b.Structure.....	29
α . Membrane	30
β . Cytoplasme.....	34
3.Facteur de von Willebrand.....	36
a.Structure.....	36
b.Rôle du vWF.....	37
4.Facteurs hémodynamiques [95].....	37
B.Temps vasculaire.....	38
C.Temps plaquettaire.....	40
1.Adhésion plaquettaire.....	40
2.Agrégation plaquettaire.....	41
3.Sécrétions ou relargages plaquettaires.....	41
IV.La coagulation ou phase plasmatique	42

A. Les différents facteurs de la coagulation	43
1. Facteur I.....	43
a. Fibrinogène.....	43
b. Fibrine	44
2. Facteur II.....	45
a. Prothrombine	45
b. Thrombine	46
3. Facteur III	48
4. Facteur IV.....	48
5. Facteur V.....	49
6. Facteur VI.....	50
7. Facteur VII.....	50
8. Facteur VIII.....	51
9. Facteur IX.....	55
10. Facteur X.....	55
11. Facteur XI	56
12. Facteur XII.....	57
13. Facteur XIII.....	57
14. Prékallitrène.....	58
15. HMW(High Molecular Weight)-kininogène.....	58
16. Autres acteurs intervenant dans la coagulation.....	59
a. Facteurs permettant la coagulation	59
α . Facteur plaquettaire 3	59
β . Facteur plaquettaire 4.....	59
b. Inhibiteurs de la coagulation [170].....	59
α . Antithrombine III	59
γ . Protéine C	60
δ . Protéine S	61
ϵ . Inhibiteur de la C'1 estérase.....	61
ζ . α 1-antitrypsine.....	61
η . α 2-macroglobuline.....	61
θ . α 2-antiplasmine.....	62
ι . Cofacteur II de l'héparine	62

B. Les différentes étapes de la coagulation.....	64
1. La voie intrinsèque de la coagulation.....	64
2. La voie extrinsèque de la coagulation.....	65
3. La voie commune de la coagulation.....	66
V. La fibrinolyse.....	68
A. Les différents acteurs DE LA FIBRINOLYSE.....	69
1. Plasminogène.....	69
2. Plasmine.....	69
3. Produits de dégradation de la fibrine.....	70
4. Activateurs du plasminogène.....	70
a. Tissue Plasminogen Activator (tPA).....	70
b. Urokinase.....	70
c. Autres.....	71
5. Inhibiteurs du plasminogène	71
a. Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI).....	71
b. Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1).....	71
c. Autres.....	72
6. Inhibiteurs de la plasmine	72
B. Les différentes étapes de la fibrinolyse.....	72
HGRP = Histidine-Rich GlycoProtein / PAI = Plasmin Activator Inhibitor / tPA = tissu Plasminogen Activator / TAFI = Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor / PDF = Produit de Dégradation de la Fibrine.....	73
Après l'étude de la physiologie de l'hémostase, la prochaine partie s'intéresse aux diverses méthodes d'exploration de l'hémostase, des plus usuelles aux dernières méthodes employées en recherche.....	74
DEUXIEME PARTIE :.....	75
exploration de l'hémostase.....	75
I. Exploration de l'hémostase primaire.....	76

A.Exploration fonctionnelle globale.....	76
1.Temps de saignement.....	76
a.Technique.....	76
b.Interprétation.....	77
c.Causes d'erreurs :.....	78
2.Temps de rétraction du clou plaquettaire [90].....	78
a.Technique.....	78
b.Interprétation et causes d'erreurs.....	79
B.Numération plaquettaire et frottis sanguin.....	80
1.Numération plaquettaire par automate.....	80
2.Numération plaquettaire manuelle [16].....	80
3.Interprétation de la numération plaquettaire [16].....	82
4.Frottis sanguin.....	82
C.Autres tests disponibles.....	82
1.Evaluation du facteur de von Willebrand.....	82
a.Dosage de la quantité de facteur de von Willebrand.....	82
α. Immunoélectrophorèse.....	82
β. Technique ELISA [16].....	83
b.Mesure de l'activité du vWF vis-à-vis de l'agglutination et de l'agrégation plaquettaire [16].....	85
c.Etude de la distribution des multimères.....	85
d.Tests génétiques.....	87
2.Test de la fonction plaquettaire.....	88
a.Test d'adhésivité.....	88
b.Test d'agrégation.....	88
α. Principe.....	89
β. Interprétation [16].....	90
c.Test de release (sécrétion) plaquettaire [16].....	90
d.Etude des glycoprotéines membranaires.....	91
e.Etude de l'activité procoagulante plaquettaire.....	91
3.Tests génétiques.....	91

II.Exploration de la coagulation.....91

A.Exploration globale.....	92
1.Temps de coagulation du sang total : technique de Lee et White [92].....	92
2.Temps de coagulation en tube ou méthode de Hayem.....	92
93	
3.Temps de Howell ou temps de recalcification plasmatique.....	93
B.Exploration des différentes voies.....	93
1.Temps de Quick.....	93
a.Principe	93
b.Interprétation.....	94
2.Temps de céphaline activée ou temps de thrombine partiellement activée.....	95
a.Principe.....	95
b.Interprétation.....	95
3.Temps de thrombine [90].....	96
4.Temps de reptilase [92].....	96
5.Temps de venin de vipère Russel dilué (dRVVT) [92].....	96
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.	
96	
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.....	97
C.Exploration des facteurs de la coagulation.....	97
D.Exploration des inhibiteurs de la coagulation [92].....	97
1.Dosage des inhibiteurs des sérines protéases.....	97
a.Dosage de l'antithrombine III.....	97
b.Dosage de l'inhibiteur de la C'1 estérase.....	97
c.Dosage du cofacteur II de l'héparine.....	98
2.Système de la protéine C.....	98
a.Dosage de la protéine C.....	98
b.Dosage de la protéine S.....	98

III.Exploration de la fibrinolyse.....	100
A.Exploration globale : Temps de lyse des euglobulines ou test de von Kaulla.....	100
B.Tests analytiques.....	100
1.Dosage du plasminogène.....	100
a.Dosage fonctionnel.....	100
b.Dosage immunologique	101
2.Dosage de t-PA, de l'urokinase et du PAI-1.....	101
3.Dosage de l' α 2-antiplasmine.....	101
C.Tests indirects.....	102
1.Dosage du fibrinogène.....	102
a.Dosage chronométrique dit de von Clauss.....	102
b.Dosage immunologique	102
2.Dosage des produits de dégradation de la fibrine (PDF).....	102
3.Dosage des D-dimères.....	103
TROISIEME PARTIE :.....	104
LES TROUBLES HEREDITAIRES de l'hémostase primaire.....	104
Les troubles héréditaires de l'hémostase primaire concernent les thrombopathies héréditaires ainsi que les différents types de maladie de von Willebrand.....	105
Lorsqu'un test génétique existe, pour chaque maladie concernée, il sera indiqué dans le tableau récapitulatif présenté en annexe 2.....	105
I.Thrombopathies constitutionnelles	105
A.Anomalies des glycoprotéines membranaires.....	105
1.Thrombasthénie de Glanzmann.....	105
a.Classification de la thrombasthénie de Glanzmann [81, 172].....	105
α . Thrombasthénie de Glanzmann de type I.....	105
β . Thrombasthénie de Glanzmann de type II.....	106
γ . Thrombasthénie de Glanzmann variant.....	106
b.Symptômes [81, 172].....	106
α . Chez l'Homme	107

β. Chez le chien [15, 16].....	107
c.Diagnostic [15].....	107
d.Support génétique de la maladie.....	111
α. Chez l'Homme.....	111
β. Chez l'Otterhound.....	112
γ. Chez le Montagne des Pyrénées.....	113
e.Traitement.....	115
2.Syndrome de Bernard-Soulier.....	115
a.Historique et épidémiologie	115
b.Symptômes.....	116
c.Etiologie moléculaire.....	116
d.Diagnostic.....	117
e.Traitement.....	118
α. Traitement hygiénique	118
β. Traitement médical.....	118
B.Anomalies de transduction du signal	118
1.Thrombopathie du Basset Hound.....	118
a.Premiers cas décrits.....	119
b.Caractérisation de la thrombopathie du Basset Hound.....	120
2.Thrombopathie du Spitz.....	121
3.Etiologie moléculaire de la thrombopathie du Basset Hound, du Spitz et du Landseer [10]	124
Boudreaux et collaborateurs ont étudiés, en 2006, un type de thrombopathie dans trois races :	
le Basset Hound, le Spitz et le Landseer. L'analyse génétique a montré que des mutations sur	
le gène codant pour le CalDAG-GEFI (Calcium-Diacylglycerol Guanine Nucleotide Exchange	
Factor I) était retrouvée à chaque fois. Trois mutations distinctes ont été détectées, touchant	
des régions importantes pour la fonction de la protéine et par conséquent dans l'agrégation	
plaquettaire. Pour autant aucun test génétique n'a encore vu le jour à l'heure actuelle.....	124
4.Autres thrombopathies décrites.....	125
a.Chez le Chien.....	125
α. Premier cas [39].....	125
β. Deuxième cas.....	125
γ. Etude de ces thrombopathies.....	126
b.Chez le Chat [38].....	128

C. Anomalies des granules denses	128
1. Maladie du pool vide du Cocker américain.....	129
a. Symptômes.....	129
b. Etiologie.....	130
c. Des gènes candidats pour la maladie du Cocker.....	131
2. Syndrome de Chédiak-Higashi chez le chat Persan.....	131
a. Description clinique et étiologie.....	132
α . Symptômes	132
β . Etiologie.....	132
γ . Diagnostic.....	133
δ . Traitement et pronostic.....	134
3. Autre anomalie des granules denses décrite [38].....	134
D. Hématopoïèse cyclique du Colley gris.....	135
1. Symptômes généraux.....	135
2. Modifications plaquettaires	138
3. Génétique.....	138
4. Traitement.....	139
E. Anomalie d'activité procoagulante plaquettaire.....	140
1. Description des cas.....	141
2. Etude de l'activité procoagulante plaquettaire.....	141
a. Test de disponibilité du Platelet Factor 3 (PF3).....	141
b. Mesure de l'activité prothrombinase plaquettaire.....	142
c. Test de consommation de la prothrombine ou mesure du ratio prothrombine sérique....	143
d. Cytométrie de flux.....	143
II. Maladie de von Willebrand.....	147
A. Définition et étiologie.....	147
1. Les différents types de maladie de von Willebrand.....	147
a. Type I	147
b. Type II.....	148
c. Type III.....	149
d. Forme acquise chez l'Homme.....	150
2. Etiologie.....	151

3.Epidémiologie.....	152
4.Symptômes.....	154
5.Diagnostic.....	157
a.Rappel : mesures de la quantité et de la qualité du vWF.....	157
b.Tests génétiques.....	158
α. Historique.....	158
γ. Tests génétiques disponibles.....	158
6.Traitement.....	159
a.Médical.....	159
α. Transfusion	159
β. Supplémentation hormonale.....	160
γ. Facteur de von Willebrand recombinant.....	161
δ. Thérapie génique.....	161
b.Prévention.....	162
α. Individuelle.....	162
β. Collective.....	162

QUATRIEME PARTIE :.....164

TROUBLES HEREDITAIRES DE LA COAGULATION.....164

I.Hémophilie A.....165

A.Généralités sur l'hémophilie	165
1.Définition :.....	165
2.Importance de l'hémophilie A :.....	165
3.Mode de transmission :.....	166
4.Les mutations dans l'hémophilie A [121]:.....	168
B.Symptômes et diagnostic de l'hémophilie	168
1.Manifestations cliniques :.....	168
2.Diagnostic :.....	171
C.Traitement :.....	174
1.Médical :.....	174
a.Tranfusion :.....	174
b.Thérapie génique :.....	175
α. Intérêt :.....	175

β. Les différentes thérapies :.....	176
c. Transplantations :.....	177
α. Greffe de cellules de moelle osseuse [204].....	177
β. Transplantation hépatique :.....	178
d. Facteur VIIa recombiné :.....	178
e. Vitamine K et préparations pro-coagulantes :.....	178
f. Utilisation des corticoïdes :.....	178
g. Danazole [80].....	179
En 1983, Gralnick et Rick ont rapporté que l'apport de danazole, un dérivé d'androgène atténué, à des doses de 1,5 à 3 mg/kg augmentait de 100 à 500 % le taux de facteur VIII chez quatre patients humains atteints d'hémophilie A [87]. Néanmoins une autre étude de Garewal et collaborateurs, en 1985, n'a montré aucun effet sur la fréquence des saignements de cinq patients atteints d'hémophilie A. L'utilisation du danazole dans le cadre d'une hémophilie A semble donc décevante.	179
h. Desmopressine :.....	179
i. Molécules contre-indiquées :.....	179
2. Prophylaxie :.....	179
a. Individuelle.....	179
b. Programmes d'éradication.....	180

II. hémophilie B.....181

A. Généralités sur l'hémophilie B.....	181
1. Définition et épidémiologie.....	181
2. Mode de transmission.....	182
3. Etude des mutations intervenant dans l'hémophilie B.....	183
B. Symptômes et diagnostic.....	185
1. Signes cliniques.....	185
2. Diagnostic.....	186
C. Traitement.....	187
1. Médical.....	187
a. Transfusion.....	187
b. Facteur IX recombinant.....	187
c. Thérapie génique.....	187

d.Danazole.....	189
e.Facteur VIIa recombiné.....	189
Comme pour l'hémophilie A, l'utilisation de facteur VIIa humain recombiné donne d'excellents résultats dans le traitement de l'hémophilie même si les réactions immunitaires et le coût en limite l'utilisation en médecine vétérinaire [131].....	189
2.Prophylaxie.....	189

III.Déficits d'origine génétique des autres facteurs de coagulation...190

A.DEFICIT HEREDItaire en fibrinogene.....	190
1.Définition et mode de transmission.....	190
2.Symptômes [74].....	191
3.Diagnostic.....	192
4.Traitement	192
B.Déficience héréditaire en prothrombine.....	193
1.Définition et mode de transmission.....	193
2.Symptômes.....	193
3.Diagnostic	194
4.Traitement	194
C.Déficit en facteur VII.....	194
1.Définition et mode de transmission.....	194
2.Symptômes.....	196
3.Diagnostic.....	196
4.Traitement.....	197
D.Déficit en facteur X	197
1.Définition et mode de transmission.....	197
2.Symptômes.....	198
3.Diagnostic.....	198
4.Traitement	199
E.Déficit en facteur XI.....	199
1.Définition et mode de transmission.....	199
2.Symptômes.....	200
3.Diagnostic.....	200
4.Traitement.....	201

F.Déficit en facteur XII	201
1.Définition et mode de transmission.....	201
2.Symptômes :	204
3.Diagnostic :	206
4.Traitement.....	206
G.Déficiance en prékallikréine.....	207
1.Définition et mode de transmission.....	207
2.Symptômes.....	207
3.Diagnostic	208
4.Traitement.....	208
H.Coagulopathie congénitale dépendante de la vitamine K.....	208
1.Définition et mode de transmission.....	208
a.Définition.....	208
b.Métabolisme de la vitamine K.....	209
c.Mutations.....	210
α . γ -Carboxylase.....	210
β . Vitamine K 2,3-époxyde réductase	211
2.Symptômes.....	211
3.Diagnostic.....	212
4.Traitement.....	213
I.Déficiences héréditaires non décrites chez les carnivores domestiques.....	214
1.Parahémophilie.....	214
2.Déficit en facteur XIII.....	214
a.Définition et mode de transmission.....	214
3.Flaujeac trait.....	214
Conclusion.....	219
BIBLIOGRAPHIE.....	222

FIGURES

Figure 1. Résumé schématique de l'hémostase primaire (d'après www.med.univ-angers.fr)	27
Figure 2. Schéma de la structure du thrombocyte [100].....	29
Figure 3. Structure du complexe sialoglycoprotéique GPIb/GPV/GPIX [205].....	33
Figure 4. Voie de formation du thromboxane A2 d'après (www.ourbiochemistry.blogspot.com)	38
Figure 5. Représentation schématique de la formation de la fibrine à partir du fibrinogène (d'après www.Tollefsen.wustl.edu)	45
Figure 6. Modélisation de la structure de la thrombine chez l'Homme [49].....	46
Figure 7. Structure protéique du facteur VII.....	50
Figure 8. Facteur VIII : De l'ADN à la protéine [222].....	54
Figure 9. Voie intrinsèque de la coagulation.....	65
Figure 10. La voie extrinsèque de la coagulation.....	66
Figure 11. La voie commune de la coagulation.....	67
Figure 12. Les étapes de la fibrinolyse.....	73
Figure 13. Aspect du papier filtre suite à la mesure du temps de saignement	77
Figure 14. Mesure du temps de coagulation [92].....	79
Figure 15. Aspect de l'hématimètre [16].....	81

Figure 16. Présentation des divers étapes du dosage du facteur de von Willebrand:Ag.....	83
Figure 17. Analyse de la distribution des multimères du facteur de von Willebrand [21].....	86
Figure 18. Agrégation plaquettaire en réponse à différents facteurs chez le Chien d'après [9].....	108
Figure 19. Distribution des glycoprotéines membranaires chez le Chien d'après [9].....	109
Figure 20. Séquence du gène codant pour le troisième domaine de la liaison au calcium de	112
Figure 21. Comparaison des séquences de l'exon 13 du gène codant	113
Figure 22. Pedigree d'une famille de Basset Hound atteinte de thrombopathie d'après [115].....	119
Figure 23. Représentation de l'agrégation plaquettaire chez le Spitz [11].....	123
Figure 24. Profil d'immunofluorescence de plaquettes chez le Spitz [11].....	124
Figure 25. Agrégation plaquettaire mesurée à l'agrégomètre [39]....	127
Figure 26. Agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP chez un Cocker [36].....	130
Figure 27. Les effets du traitement d'un Colley gris atteint d'hématopoïèse cyclique	139
Figure 28. Activité prothrombinase plaquettaire en réponse à un traitement agoniste [24].....	142

Figure 29. Pedigree d'une famille de Drahtaars où est présente la maladie de	148
Figure 30. Pedigree d'une famille de Scottish terriers où est présente la maladie de	150
Figure 31. Distribution de l'intensité des symptômes cliniques observés sur une population de 89 dobermans affectés cliniquement [202].....	155
Figure 32. Localisation et circonstances d'apparition des épisodes de diathèse hémorragique	156
Figure 33. Exemple de pedigree d'une famille de chats British shorthairs.....	182
Figure 34. Comparaison des séquences du gène codant pour le facteur IX et de la séquence en acides aminés du facteur IX d'un Lhasa Apso normal et d'un Lhasa Apso atteint d'hémophilie B.....	185
Figure 35. Taux d'IgM, d'IgG1 et d'IgG3 chez un chien suite à l'administration d'un adénovirus recombiné [164].....	188
Figure 36. Pedigree d'une famille d'Alaskan klee kai atteinte de déficience en facteur VII [119].....	195
Figure 37. Pedigree d'une famille de chat déficient en facteur XII [122].....	202
Figure 38. Métabolisme de la vitamine K.....	209

I.

TABLEAUX

Tableau 1. Propriétés des facteurs de la coagulation chez l'Homme..	63
Tableau 2. Comparaison des résultats aux examens complémentaires entre la maladie de von Willebrand et les différents types de thrombasthénie de Glanzmann d'après [16].....	108
Tableau 3. Agrégation plaquettaire de chiens normaux et de chiens thrombopathiques.....	126
Tableau 4. Fréquence des signes cliniques observés lors du cycle hématopoïétique.....	136
Tableau 5. Distribution des pourcentages de lésions par organes à l'autopsie par organes dans	137
Tableau 6. Diagnostic des thrombopathies constitutionnelles héréditaires (1ère partie).....	145
Tableau 7. Diagnostic des thrombopathies constitutionnelles héréditaires (2ème partie).....	146
Tableau 8. Principales races concernées par les différents types de maladie de von Willebrand [45].....	153
Tableau 9. Fréquence des génotypes pour la maladie de von Willebrand de type I dans 5 races d'après www.vetgen.com, données de 2005.....	153
Tableau 10. Fréquence des génotypes pour la maladie de von Willebrand de type III	154
Tableau 11. Caractéristiques biochimiques des 3 types de la maladie de von Willebrand [189].....	158

Tableau 12. Résumé des caractéristiques des différents types de maladie de von Willebrand.....	162
Tableau 13. Classification clinique de l'hémophilie A chez le Chien [136].....	168
Tableau 14. Classification de l'hémophilie A canine d'après Stokol et collaborateurs 1994 [210].....	169
Tableau 15. Signalement de 51 chats présentant des déficiences héréditaires.....	205
Tableau 16. Bilan d'hémostase standard en fonction du trouble héréditaire de la coagulation.....	216
Tableau 17. Troubles héréditaires de la coagulation (1ère partie)....	216
Tableau 18. Troubles héréditaires de la coagulation (2ème partie)...	217

II.

ABREVIATIONS

AAV	Virus Adéno-Associé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AMP (c)	Adénosine MonoPhosphate (cyclique)
ATP	Adénosine TriPhosphate
βGT	B-Thrombomoduline
COX	Cyclo-oxygénase
DAG	DiAcylGlycérol
dRVVT	Test au Venin de Vipère Russell diluée
EDTA	Acide Ethylène Diamine TétrAcétique
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELCA	<i>Enzym Linked Coagulation Assay</i>
ELFA	<i>Enzym Linked Fluorescent Assay</i>
ELISA	<i>Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
Facteur VKD	Facteur Dépendant de la Vitamine K
FReD	<i>Fibrinogen Related Domain</i>
GCSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
GDP	Guanosine DiPhosphate
GLA	Domaine riche en acide γ-carboxyglutamique

GMP (c)	Guanosine MonoPhosphate (cyclique)
GP	GlycoProtéine
HC II	Cofacteur de l'Héparine II
HMWK	<i>High Molecular Weight Kininogen</i>
HGRP	<i>Histidine Rich GlycoProtein</i>
IDP	Indice de Distribution Plaquettaire
Ig	Immunoglobuline
IP3	Inositol triPhosphate
IRMA	<i>Immune Radio-Metric Assay</i>
KH2	Vitamine K Hydroquinone
KO	Vitamine K Epoxyde
LINE	<i>Long Interspersed Nuclear Element</i>
LTB4	Leucotriène B4
NADP	Nicotinamide Adénine DiPhosphate
NO	Monoxyde d'azote
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PAI	Inhibiteur des activateurs du plasminogène
PAR	<i>Protein Activated Receptor</i>
PC	Phosphatidylcholine
PCa	<i>Protein C activator</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDF	Produit de Dégradation de la Fibrine
PDGF	<i>Platelet Derivated Growth Factor</i>

PE	Phosphatidyléthanolamine
PF-3	Facteur Plaquettaire 3
PF-4	Facteur Plaquettaire 4
PG	Prostaglandine
PI	Phosphatidylinositol
PNA	ParaNitroAnilline
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
PS	Phosphatidyldéine
S	Shingosine
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SINE	<i>Short Interspersed Nuclear Element</i>
TAFI	<i>Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor</i>
TFPI	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
tPA	Activateur tissulaire du Plasminogène
VIII:Ag	Antigène du facteur VIII
VKD	Dépendant de la Vitamine K
vWF	Facteur de von Willebrand
vWF:Ag	Antigène du facteur de von Willebrand
ADP	Adénosine DiPhosphate

AMP	Adénosine MonoPhosphate
ATP	Adénosine TriPhosphate
dRVVT	Test au Venin de Vipère Russell diluée
ELISA	Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay
Facteur VKD	Facteur Dépendant de la Vitamine K
GP	GlycoProtéine
HMWK	High Molecular Weight Kininogen
NO	Monoxyde d'azote
PAI	Inhibiteur des activateurs du plasminogène
PF-3	Facteur Plaquettaire 3
PF-4	Facteur Plaquettaire 4
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
TFPI	Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
tPA	Activateur tissulaire du Plasminogène
vWF	Facteur de von Willebrand

INTRODUCTION

La cynophilie moderne s'intéresse, de nos jours, de plus en plus à la génétique. En effet diminuer la prévalence des maladies génétiques est devenu un enjeu majeur pour les clubs de race et de nombreux programmes d'éradication ont vu le jour récemment. La dissémination de l'hémophilie A au sein de la race Berger allemand à partir d'un étalon, Canto von der Wienerau, a fait prendre conscience aux éleveurs de l'importance des coagulopathies héréditaires. Pourtant, les troubles héréditaires de l'hémostase sont, dans leur grande majorité, très mal connus en médecine vétérinaire et sont donc très peu diagnostiqués. Des progrès importants ont été réalisés ces dernières années au niveau de la recherche, notamment dans les pays anglo-saxons, mais ces troubles restent très peu étudiés en France.

Aussi, le but de cette étude est de proposer un bilan des connaissances actuelles, à la fois sur les maladies bien connues comme l'hémophilie A ou la maladie de von Willebrand, mais aussi sur des maladies de découverte récente. Il sera également proposé un point sur les connaissances en médecine humaine sur certaines maladies n'ayant jamais été décrites chez les animaux, certainement par absence de recherche.

Après quelques rappels sur l'hémostase et son exploration, seront donc étudiés les états d'hypocoagulabilités héréditaires. Chaque maladie se verra étudiée selon son étiologie, ses symptômes, son diagnostic et son traitement.

PREMIERE PARTIE :

PHYSIOLOGIE DE L'HEMOSTASE

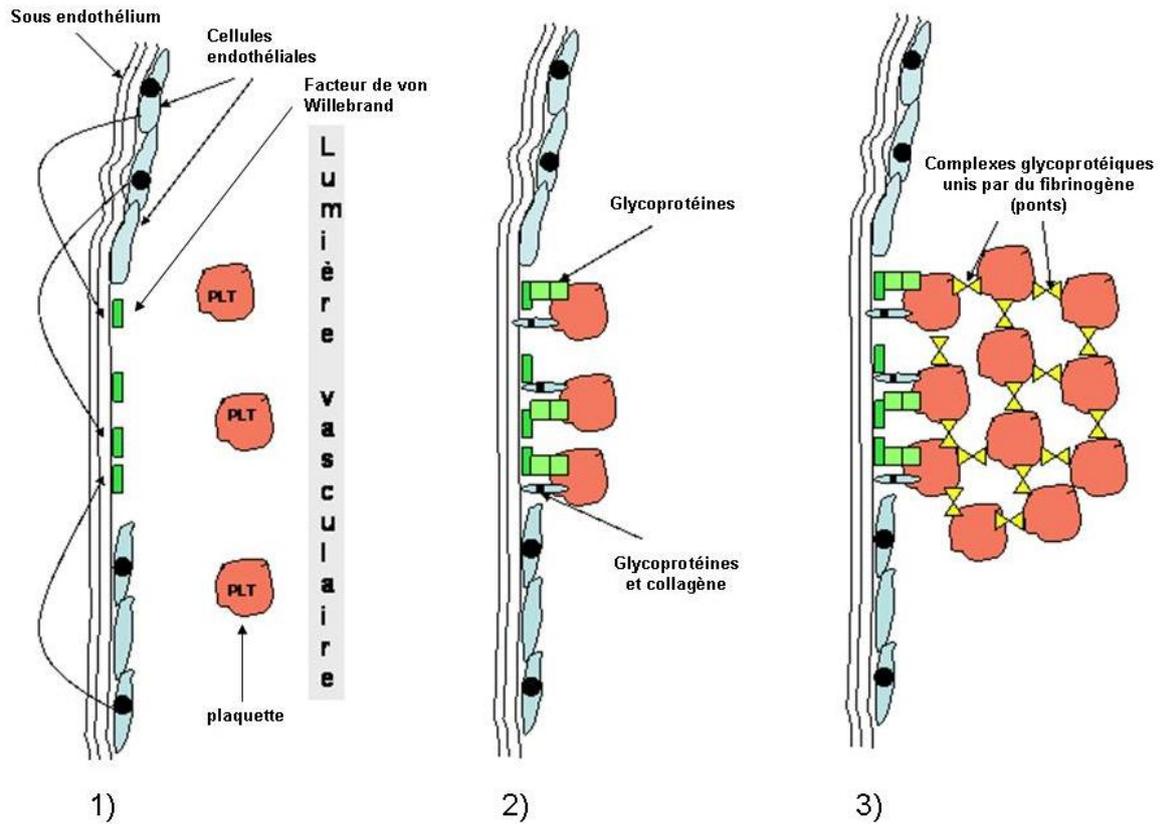
III. L'HÉMOSTASE PRIMAIRE

L'hémostase primaire est un système physiologique survenant suite à une lésion vasculaire et dont les interactions complexes aboutissent à la formation d'un caillot plaquettaire stable, le clou plaquettaire. Lors de lésion vasculaire, la barrière des cellules endothéliales est rompue et la mise à nue du sous-endothélium induit une diminution locale des facteurs inhibant l'adhésion plaquettaire et une exposition du collagène sous-endothélial. Ces différents événements entraînent l'initiation simultanée des deux temps de l'hémostase primaire : le temps vasculaire et le temps plaquettaire.

Elle fait intervenir le vaisseau, les plaquettes et les protéines de la coagulation. C'est un phénomène localisé, rapide grâce à une auto-amplification locale mais néanmoins régulé négativement de façon à ne pas obstruer le vaisseau.

Le schéma synthétique (Figure 1) résume de façon simplifiée l'hémostase primaire. Les deux temps de l'hémostase seront détaillés dans les paragraphes B et C de ce I.

Figure 1. Résumé schématique de l'hémostase primaire (d'après www.med.univ-angers.fr)



Légende :

- 1) Le sous endothélium mis à nu par la brèche vasculaire laisse apparaître des molécules de collagène et du facteur de von Willebrand (synthétisé par les cellules endothéliales).
- 2) Les plaquettes circulantes se lient au facteur de von Willebrand et au collagène par l'intermédiaire de glycoprotéines.
- 3) Les plaquettes se lient entre elles en formant des ponts à l'aide de glycoprotéines et de fibrinogène. Le clou plaquettaire est alors formé et bouche la brèche vasculaire.

Avant d'aborder les deux temps de l'hémostase primaire, nous allons détailler les caractéristiques des différents acteurs intervenant dans ce phénomène.

A. ELÉMENTS INTERVENANT DANS L'HÉMOSTASE PRIMAIRE

1. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales reposent sur une membrane basale, constituée de protéines de la matrice extracellulaire sécrétées par les fibroblastes, qui les sépare des cellules sous-jacentes. A l'extérieur de la membrane basale, on trouve les fibres musculaires lisses de la média.

Les cellules endothéliales intactes sécrètent différents facteurs permettant d'inhiber l'adhésion et l'agrégation des plaquettes afin d'éviter la formation de thrombus dans le système sanguin. Deux composés principaux, la prostacycline et le monoxyde d'azote, interviennent dans ce mécanisme. Ils ont une action vasodilatatrice et s'opposent à l'adhésion plaquettaire en complément de la charge négative de la surface cellulaire.

Une ecto-ADPase est présente à la surface des cellules endothéliales et dégrade un agoniste plaquettaire, l'ADP (Adénosine Di-Phosphate) en AMP (Adénosine Mono-Phosphate) limitant ainsi le recrutement plaquettaire [150].

a. Prostacycline

La prostacycline (ou PGI₂) est un époxyde dérivé d'une prostaglandine, la prostaglandine H₂ suite à son activation par la prostacycline synthétase. Ces effets sont opposés à ceux du thromboxane A₂. Elle active l'adénylcyclase plaquettaire et entraîne une élévation du niveau intracellulaire d'AMPc (Adénosine Mono-Phosphate cyclique) d'où une inhibition de la réactivité plaquettaire. Ses propriétés vasodilatatrices sont très puissantes [95].

b. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote, de formule NO, entraîne une élévation du niveau intracellulaire de GMPc (Guanosine Mono-Phosphate cyclique) dans les cellules endothéliales ; il en résulte alors le maintien d'une concentration cytoplasmique basse en calcium et une diminution consécutive de l'activité de la phospholipase C qui intervient dans la voie de synthèse des phospholipides impliqués dans l'hémostase (voir la partie 2bα de cette partie) [95].

Il est synthétisé à partir de la L-Arginine sous l'action de la NO synthase. Le frottement du sang sur la paroi du vaisseau semblerait être le stimulus de cette synthèse.

c. Autres rôles

La surface de l'endothélium contient la thrombomoduline dont le rôle est de limiter l'action de la thrombine sur le fibrinogène et d'activer le système de la protéine C.

Des protéoglycanes de surface lient l'antithrombine III et le TFPI (*Tissu Factor Pathway Inhibitor*) ce qui limite l'activité procoagulante du milieu.

Enfin les cellules endothéliales libèrent le *tissu Plasminogen Activator* (tPA) responsable de l'activation de la fibrinolyse ainsi que de la protéine régulant son activité, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1).

2. Plaquettes

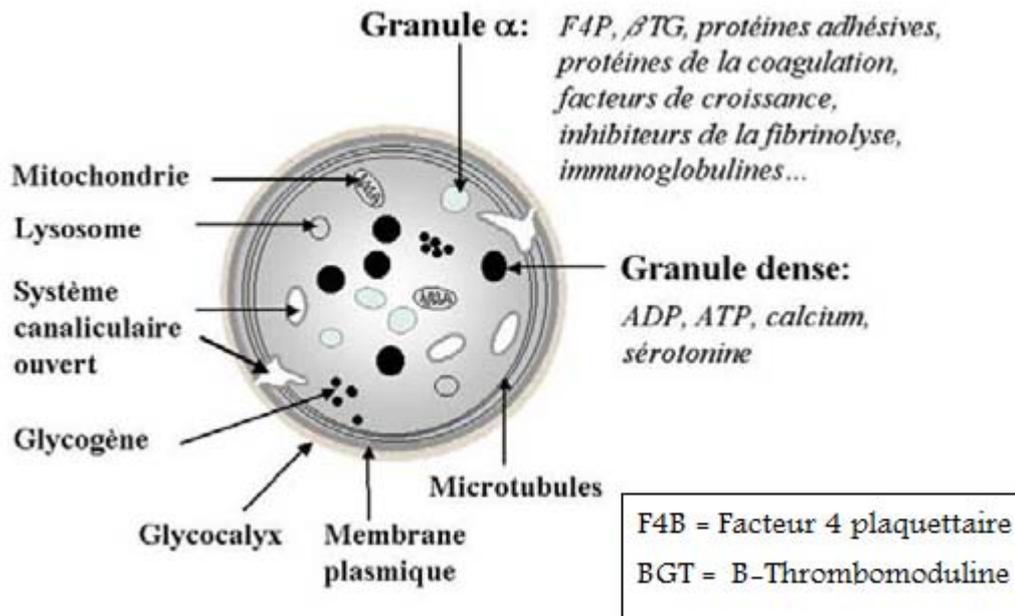
a. Origine

Les thrombocytes sont synthétisés dans la moelle osseuse en plusieurs étapes. Les mégacaryoblastes se transforment progressivement en mégacaryocytes dont la fragmentation cytoplasmique est à l'origine des thrombocytes. La durée de cette production plaquettaire est d'une dizaine de jours.

b. Structure

Les plaquettes sont des cellules anucléées discoïdes à l'état inactif. Elles mesurent entre 5 et 7 μm de diamètre pour une épaisseur de 3 μm soit le dixième de la taille d'une hématie. Elles contiennent des granules dont le contenu est sécrété lors de l'activation via un système caniculaire ouvert sur l'extérieur (Figure 2) [95].

Figure 2. Schéma de la structure du thrombocyte [100]



Légende :

- le granule α contient le F4B (Facteur 4 plaquettaire), le β GT (β -Thrombomoduline), des protéines de la coagulation, des facteurs de croissance, des inhibiteurs de la fibrinolyse, des immunoglobulines ...,
- les granules denses contiennent notamment de l'ADP, de l'ATP, du calcium et de la sérotonine.

α . Membrane

La membrane plaquettaire est couverte par une glycocalyx épaisse de 15 à 20 nm, riche en facteurs de la coagulation (II, VII, IX, X, XII) plus ou moins solidement ancrés, en amines vaso-actives et en facteur de von Willebrand.

Chargée négativement, la membrane entraîne la répulsion entre plaquettes et entre les plaquettes et l'endothélium vasculaire. La régulation du fonctionnement plaquettaire est assurée par les phospholipides membranaires qui sont à la base des messagers intracellulaires et de métabolites actifs. Enfin les plaquettes contiennent des glycoprotéines, comme les intégrines, intervenant dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire.

- Les phospholipides membranaires

Ils ont une importance considérable d'un point de vue fonctionnel et quantitatif. Les quatre phospholipides membranaires les plus importants sont : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la sphingosine (S) et la phosphatidylsérine (PS). La structure est complétée par d'autres phospholipides tels que le phosphatidylinositol (PI).

A l'état normal la distribution de ces molécules est asymétrique :

- les phospholipides chargés négativement (PS et PE) sont présents sur l'hémimembrane interne,
- les phospholipides neutres (PC et S) se trouvent sur l'hémimembrane externe.

Cette distribution est permise par l'action de deux enzymes : une translocase ATP dépendante qui transporte les PS et les PE depuis l'hémimembrane externe vers l'hémimembrane interne et une « floppase » qui transporte la PC et une partie de la PS depuis l'hémimembrane interne vers l'hémimembrane externe. Le maintien de ce système dépend du pool d'ATP et de la concentration cytoplasmique en calcium.

Lors de l'activation plaquettaire, la présence de calcium permet l'activation de la phospholipase A2 responsable de l'hydrolyse de la PC et la PE en acide arachidonique qui est alors exporté vers d'autres cellules pour la synthèse d'autres composants tels que la prostacycline (dans les cellules endothéliales) ou les leukotriènes (dans les leucocytes). Dans les plaquettes l'acide arachidonique subit l'action de la cyclo-oxygénase 1 (COX-1) et de la lipooxygénase qui sont à l'origine de la prostacycline, et surtout du thromboxane A2.

L'activation plaquettaire amène la translocation de la PS vers l'hémimembrane externe où la PS joue un rôle de cofacteur avec la thrombine.

Enfin l'activation plaquettaire amène l'activation de la phospholipase C en présence de calcium. Elle hydrolyse alors le phosphatidylinositol en inositol triphosphate (IP-3) et en 1,2-diacylglycérol (DAG). L'IP-3 active alors une ATPase calcium dépendante qui permet de mobiliser le calcium à partir du système tubulaire dense et des granules denses. Quant au DAG, il active une protéine kinase C à l'origine d'un changement de conformation des complexes glycoprotéiques GPIIb/IIIa avec augmentation des liaisons avec les ligands. Ces deux actions participent au changement de morphologie plaquettaire, à la modification des récepteurs et à la sécrétion des granules plaquettaires. Ils sont ensuite recyclés et réincorporés à la membrane sous forme de PI.

➤ Les intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines intervenant dans la médiation de nombreuses interactions cellulaires parmi lesquelles l'adhésion et l'agrégation plaquettaire.

Chaque intégrine est constituée de deux sous-unités (α et β) reliées de manière non covalente. Chacune d'elle comporte un domaine extracellulaire possédant des sites de liaison aux cations divalents, un domaine membranaire et un domaine cytoplasmique connecté au cytosquelette par l'intermédiaire de protéines et de complexes intervenant dans la transmission des signaux cellulaires. Le gène codant pour ces deux sous-unités a été localisé sur le chromosome 17 en position 17q21-23 chez l'Homme.

De nombreuses intégrines sont localisées sur les plaquettes et parmi celles-ci la plus abondante est l'intégrine α Ib β IIIa (40 000 à 80 000 par plaquette). Cette intégrine est également nommée complexe glycoprotéique Iib/IIIa (GPIIb/IIIa) et n'est détectée, dans les cellules hématopoïétiques, que dans la lignée mégacaryocytaire.

Lors de l'activation plaquettaire, les intégrines « cachées » sont transloquées à la surface des thrombocytes où elles se regroupent sous l'influence de signaux cytoplasmiques qui entraînent simultanément des changements de conformation de ces molécules, permettant l'exposition de récepteur au fibrinogène. Les intégrines peuvent aussi lier d'autres molécules comme le facteur de von Willebrand (GPIb/IX), le collagène (GPIa/IIa – interaction rapide et rapidement irréversible) ou la fibronectine.

➤ Les glycoprotéines riches en leucine

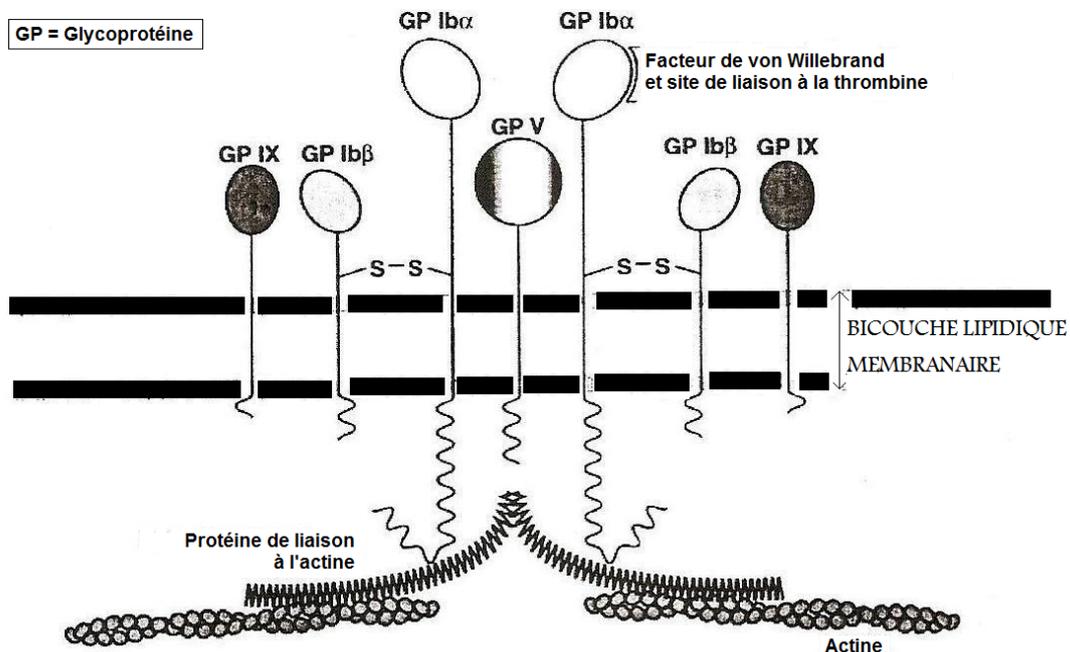
Ce type de glycoprotéine possède un domaine riche en leucine. Il en existe plusieurs types :

- GPIb constitué de 2 unités (GPIb α et GPIb β) liées par un pont disulfure,
- GPIX associée à GPIb en un complexe GPIb/GPIX,
- GPV qui forme un pont entre GPIb et GPIX grâce à son interaction avec GPIb α .

Ces trois glycoprotéines forment un complexe sialoglycoprotéique qui contribue à la charge négative de la surface plaquettaire (Figure 3). C'est également un site d'interaction avec la thrombine et le facteur de von Willebrand (GPIb α). La partie GPIb β possède dans sa partie

cytoplasmique un site de phosphorylation des protéines intervenant dans la réorganisation du cytosquelette lors de l'activation plaquettaire.

Figure 3. Structure du complexe sialoglycoprotéique GPIb/GPV/GPIX [205]



Légende :

- La glycoprotéine GPIb est constituée de 2 sous-unités reliées par un pont disulfure. La sous-unité GPIb α possède des sites de liaison avec le vWF et la thrombine et sa partie cytoplasmique est liée au cytosquelette par l'intermédiaire d'une protéine de liaison à l'actine. La sous-unité GPIb β comporte dans sa partie cytoplasmique un site de phosphorylation des protéines intervenant dans la réorganisation du cytosquelette lors de stimulation par un agoniste,
- La glycoprotéine GPV forme un pont entre les complexes GPIb/GPIX par son interaction avec GPIb α ,
- La glycoprotéine GPIX est liée à la sous-unité GPIb β pour former le complexe GPIb/GPIX.

➤ Autres récepteurs membranaires

Les agonistes plaquettaires (ADP, *Platelet Activating Factor*, épinéphrine, thromboxane A₂, thrombine) se fixent sur des récepteurs membranaires couplés à une protéine G, dont l'activation amène une élévation de la concentration cytoplasmique en calcium et une augmentation de l'activité de certaines enzymes. L'activation plaquettaire par l'ADP est notamment à l'origine de la coagulation et permet le recrutement de plaquettes et de leucocytes au niveau du clou primaire [144].

β. Cytoplasme

Le cytoplasme contient, comme dans toutes les cellules un cytosquelette à l'origine du changement de conformation des plaquettes. Mais il comprend également un système canaliculaire et un système granulaire constitué de granules α et de granules denses, dont la libération sera le point de départ de nombreuses réactions.

➤ Cytosquelette

Le cytosquelette est constitué de filaments d'actine qui sont les éléments contractiles du thrombocyte. Ils permettent le changement de conformation nécessaire à l'action de la plaquette lors de sa stimulation ainsi que l'émission de pseudopodes. Tous ces mécanismes sont importants pour la diffusion et l'adhésion plaquettaire, l'agrégation, la sécrétion et enfin la rétraction du clou plaquettaire. L'activité du cytosquelette est dépendante de la concentration plasmatique en calcium.

Comme il a été vu précédemment, de nombreux récepteurs membranaires sont associés à des protéines interagissant avec les filaments d'actine du cytosquelette. Cette organisation facilite le regroupement des récepteurs nécessaires à la transduction du signal, à l'évagination du système canaliculaire ouvert et à l'activation plaquettaire. L'activation des récepteurs (le GPIb ou le complexe GPIIb/GPIIIa) entraîne notamment la polymérisation de l'actine et l'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium. Le calcium active alors une myokinase qui induit la contraction du cytosquelette.

Les microtubules et les filaments intermédiaires sont d'autres éléments du cytosquelette. Les microtubules sont responsables de la forme discoïde du thrombocyte au repos et leur dépolymérisation est une conséquence de l'activation plaquettaire. Quant aux filaments

intermédiaires, ils constituent la charpente de la cellule et participent à la stabilisation des autres éléments cytosquelettiques lors de l'activation.

➤ Système canaliculaire

Le système canaliculaire est en fait constitué de deux types de canalicules :

- des canalicules connectés à la surface, constituant le système canaliculaire ouvert, formés par des invaginations de la membrane plasmique. Grâce à ses relations avec les constituants plasmatiques, le système est le siège préférentiel d'endocytose des protéines plasmatiques et d'exocytose du contenu des granules lors de la phase de « release » plaquettaire,
- des canalicules denses, regroupés sous le thème de système canaliculaire dense, issus du réticulum endoplasmique des mégacaryocytes. Le système canaliculaire dense est le site de synthèse de prostaglandines et de thromboxanes. Un de ses rôles les plus importants est le stockage d'ions calcium nécessaires à l'activation. Ce stockage fait intervenir des pompes ATPases calcium-dépendantes dont la régulation est assurée par l'AMPc. La concentration en AMPc est régulée par l'adénylcyclase qui permet sa synthèse à partir de l'ADP ou de l'ATP et par la phosphodiesterase qui assure la réaction inverse. La réactivité plaquettaire est abaissée par la présence d'AMPc car celle-ci inhibe la mobilisation du calcium et diminue l'activité de la phospholipase C.

➤ Système granulaire

Il existe trois types de granules plaquettaires dont le contenu peut être libéré lors de l'activation plaquettaire.

Les granules α sont les plus nombreux. Ils contiennent des facteurs de la coagulation (facteur V), des protéines spécifiques des plaquettes (β thromboglobuline), des protéines d'adhésion (fibrinogène, facteur de von Willebrand, fibronectine, thrombospondine), des protéines plasmatiques (albumine, Immunoglobuline G (IgG)), des facteurs de croissance (*Transforming Growth Factor* β (TGF β), *Platelet derived growth factor* (PDGF)) et des inhibiteurs de protéase (α 2-macroglobuline, α 2-antiplasmine) [98]. Ces protéines ont deux origines :

- une biosynthèse au niveau des mégacaryocytes comme pour le *Platelet factor 4*,
- une endocytose ou une pinocytose comme pour l'IgG.

La membrane de ces granules α contient de nombreux récepteurs tels que les GPIIb/IIIa, le GPIb ou la P-sélectine.

Les granules denses (ou δ) contiennent de la sérotonine, des ions divalents (dont notamment le calcium) et des nucléotides (ADP, ATP, GDP, GTP ... avec notamment un ratio ATP/ADP égal à 2/3). La membrane des granules δ possèdent aussi quelques récepteurs GPIb et GPIIb/IIIa.

Les lysosomes sont des réservoirs d'hydrolases acides (protéase, lipase, carbohydrase) capables de dégrader des composés endocytés ou, lors de leur fusion avec le système canaliculaire ouvert, de libérer ces hydrolases dans le milieu extracellulaire.

3. Facteur de von Willebrand

a. Structure

Le facteur de von Willebrand est une glycoprotéine synthétisée au niveau des cellules endothéliales et des mégacaryocytes, ces derniers en synthétisant entre 10 et 25 % selon l'espèce. Il est présent dans le plasma, dans les granules α des thrombocytes, dans les cellules endothéliales et dans le sous-endothélium.

Le facteur de von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine multimérique dont le poids moléculaire est variable entre 540 à plusieurs millions de kDa en fonction du degré de polymérisation qui lui-même dépend de la localisation anatomique du vWF. Chez l'Homme sa concentration plasmatique est comprise entre 5 et 10 mg/L. Cette protéine contient plusieurs domaines fonctionnels : des sites de liaison pour le collagène, des autres sites pour l'héparine, un site pour la GPIb et un pour la GPIIb/IIIa [170].

Il existe de nombreux facteurs influençant le taux sanguin en vWF. On peut notamment citer : l'exercice physique intense, le stress, la gestation, la lactation, les chaleurs, les affections hépatiques, les inflammations, l'azotémie, l'hypothyroïdie, l'hypoglycémie. L'utilisation de certaines substances comme la vasopressine, l'adrénaline, l'acépromazine ou la xylazine modifie aussi ce taux donc il faudra en tenir compte lors de dosage réalisé sur des prélèvements obtenus suite à une anesthésie [170]. Enfin les conditions de recueil de l'échantillon sanguin jouent un rôle

dans l'augmentation artificielle du taux de vWF ; en effet, un traumatisme tissulaire conduit à une libération de ce facteur par les cellules endothéliales voisines.

Le gène codant pour le vWF a été localisé sur le chromosome 12 en position 12p12-12pter et contient 52 exons qui représentent 178 kilobases chez l'Homme. La séquence est connue depuis peu chez le Chien [170].

b. Rôle du vWF

Ce facteur possède deux rôles majeurs dans l'hémostase :

- il participe à l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium au cours de l'hémostase primaire,
- il intervient dans la coagulation plasmatique dans le transport et la stabilité du facteur VIII circulant (VIII:C).

Lors de lésion vasculaire, le vWF se lie aux GPIb des plaquettes et sert de pont entre les thrombocytes et le sous-endothélium. Un changement de conformation du vWF intervient durant ce processus pour faciliter ces interactions. Les multimères de haut poids moléculaire ont une efficacité plus importante en raison du nombre plus important de sites de liaison.

Dans le plasma, la liaison du vWF au facteur VIII:C est une liaison non covalente qui permet d'assurer la stabilité du facteur VIII:C en le protégeant de la dégradation protéolytique. Toutefois il semble que, chez le Chien, ce rôle protecteur soit moins important que chez l'Homme [16].

4. Facteurs hémodynamiques [95]

Lorsque l'écoulement du sang est linéaire, l'adhésion des thrombocytes au sous-endothélium augmente avec le diamètre des vaisseaux, la vitesse de circulation du sang, la concentration en hématies et la concentration en plaquettes. Au niveau des courbures, des bifurcations et des rétrécissements, le sang stagne ce qui entraîne une activation plaquettaire et donc une plus grande adhésivité de ces dernières au sous-endothélium favorisant une thrombose.

Plus la vitesse du sang est élevée plus les plaquettes arrivent rapidement au site de lésion et donc plus l'hémostase primaire a un rôle important. Quand la circulation est lente, la coagulation

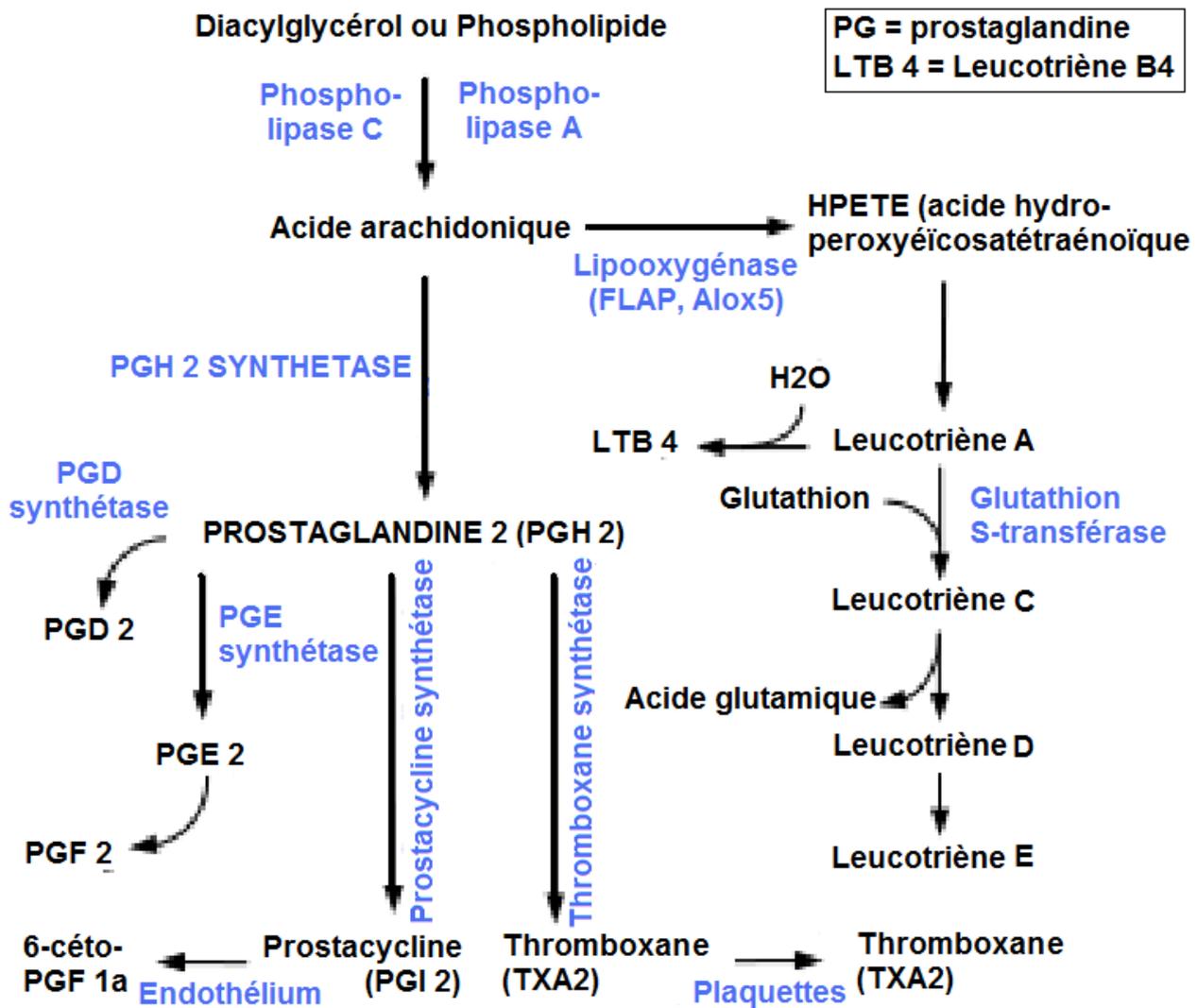
plasmatique est prépondérante. Par conséquent dans les veines où la circulation sanguine s'effectue à faible vitesse, le caillot est formé surtout de fibrine, alors que dans les capillaires il est essentiellement plaquettaire. Au niveau des artères, le caillot est mixte.

B. TEMPS VASCULAIRE

Lors de lésion de petits vaisseaux, le premier phénomène à se mettre en place est une vasoconstriction passive liée à l'élasticité de la paroi, indépendante de la vasoconstriction artérielle. Cette vasoconstriction devient rapidement active grâce à une contraction réflexe des fibres musculaires lisses de la paroi vasculaire [42].

Dans le même temps, des plaquettes adhèrent au niveau de la lésion ; ce phénomène les amène alors à sécréter des molécules vasoconstrictrices telles que la sérotonine, l'adrénaline et la noradrénaline. De plus l'acide arachidonique des phospholipides de la membrane plaquettaire est mobilisé afin de permettre la synthèse de thromboxane A2 (Figure 4).

Figure 4. Voie de formation du thromboxane A2 d'après (www.ourbiochemistry.blogspot.com)



Légende : l'enzyme indiquée en regard des flèches et celle permettant la réaction (exemple : le PGH 2 synthétase permet la formation de prostaglandine 2 à partir d'acide arachidonique). Lorsque diverses enzymes interviennent c'est le lieu de la réaction qui est indiqué (endothélium ou plaquettes).

Le thromboxane A2 est une molécule aux propriétés vasoconstrictrices et proagrégantes plaquettaires.

Les cellules endothéliales activées expriment à leur surface le facteur tissulaire dont l'interaction avec le facteur VII est à la base de la voie extrinsèque de la coagulation aboutissant à la formation de thrombine. La thrombine initie la cascade de réactions nécessaires à l'agrégation plaquettaire :

changement de conformation, agrégation, sécrétion du contenu des granules et synthèse de composés réactifs. Ces cellules sécrètent dans le même temps le facteur de von Willebrand qui va alors être libéré dans le plasma et se lier au sous-endothélium [95].

C. TEMPS PLAQUETTAIRE

La première étape du temps plaquettaire correspond à l'adhésion des thrombocytes sur le sous-endothélium ce qui est le point de départ d'une réaction en chaîne aboutissant à la sécrétion des granules plaquettaires. En parallèle les plaquettes adhèrent entre elles et forment un clou plaquettaire.

1. Adhésion plaquettaire

Physiologiquement, les plaquettes n'adhèrent pas sur un endothélium sain grâce à divers mécanismes vus précédemment. Lors d'une lésion de cet endothélium vasculaire, l'exposition de la matrice sous-endothéliale riche en collagène permet l'adhésion des thrombocytes. La nature des récepteurs et des ligands dépend des conditions hémodynamiques. Lorsque que le débit est peu important (cas des veines), les plaquettes adhèrent au collagène, à la laminine et à la fibronectine grâce aux complexes GPIIb/IIIa. Par contre, lorsque le débit est plus important (cas des artérioles), l'adhésion se fait par l'intermédiaire du vWF et des récepteurs GPIb/GPV/GPIX. Le vWF plasmatique se lie d'une part au collagène et aux glycosaminoglycanes du sous-endothélium et d'autre part aux récepteurs thrombocytaires. Ces liaisons amènent un changement de conformation du vWF avec une augmentation de l'affinité pour la GPIb.

Cette adhésion entraîne l'expression des complexes GPIIb/IIIa à la surface des plaquettes ainsi que la libération plaquettaire de vWF, ce qui va amplifier le phénomène. Cette activation des plaquettes se fait sur environ 10 à 20 secondes. La présence des complexes GPIIb/IIIa permet la liaison des plaquettes activées au fibrinogène ce qui est à l'origine de l'agrégation plaquettaire.

De discoïdes, les plaquettes deviennent sphériques et émettent de nombreux pseudopodes accroissant ainsi considérablement la surface membranaire et donc l'exposition des différents récepteurs. La sécrétion des granules stimulent aussi l'agrégation plaquettaire.

Le calcium joue un rôle prépondérant dans tous ces phénomènes notamment au niveau du cytosquelette pour le changement de conformation des plaquettes. Le calcium est aussi impliqué dans la synthèse d'acide arachidonique et par conséquent dans la synthèse du thromboxane A2.

2. Agrégation plaquettaire

Le fibrinogène lié aux complexes GPIIb/IIIa permet la formation de ponts, à la fois entre les plaquettes déjà liées au sous-endothélium, mais aussi avec des plaquettes nouvellement recrutées. L'agrégation est renforcée par la présence d'agonistes plaquettaires stockés dans les granules denses (ADP, sérotonine, épinéphrine) ou nouvellement synthétisés (*Platelet Activating Factor*, thromboxane A2) qui sont libérés lors de l'activation plaquettaire.

L'agrégation plaquettaire est aussi à l'origine d'une activité procoagulante de la part des thrombocytes. La régulation de la distribution des phospholipides membranaires est à la base de ce mécanisme. L'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium provoque l'inhibition de la translocase et de la « floppase » rendant possible les mouvements entre les deux hémimembranes des phospholipides. L'activation induit dans le même temps des sites de liaison pour les facteurs V activé et VIII activé ce qui permet l'activation de la prothrombine en thrombine par les voies intrinsèque et commune de la coagulation.

3. Sécrétions ou relargages plaquettaires

Cette fonction correspond à la libération dans le milieu, par exocytose, des molécules stockées au sein des granules plaquettaires. Ainsi sont principalement libérés :

- l'ADP, qui stimule l'agrégation plaquettaire,
- la sérotonine et l'adrénaline, aux propriétés vasoconstrictrices,
- le facteur plaquettaire 3 (PF-3), qui favorise la coagulation,
- le thromboxane A2, vasoconstricteur et proagrégant.

Cette sécrétion dépend également énormément de la concentration cytoplasmique en calcium. Par exemple, les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont une action inhibitrice de ce phénomène.

IV. LA COAGULATION OU PHASE PLASMATIQUE

L'hémostase primaire suffit à stopper un saignement dû à la lésion d'un capillaire. Elle est renforcée par le phénomène de coagulation si le vaisseau endommagé est de plus gros diamètre. La coagulation est l'ensemble du processus qui conduit à la formation du caillot sanguin par transformation du fibrinogène, protéine plasmatique soluble, en fibrine insoluble. La phase plasmatique fait intervenir de nombreux facteurs qui interagissent entre eux.

A. LES DIFFÉRENTS FACTEURS DE LA COAGULATION

Les facteurs de coagulation sont désignés par un numéro dont l'origine dépend de leur découverte. Les différents facteurs nécessitent une activation, on les désigne alors par la lettre a (exemple : facteur VII activé = VIIa).

1. Facteur I

a. Fibrinogène

Le facteur I ou fibrinogène est une protéine plasmatique soluble dont la conversion en fibre insoluble se fait par l'action de la thrombine ou d'enzymes *thrombin-like*.

Il est synthétisé principalement au niveau des hépatocytes, mais aussi au niveau des mégacaryocytes. Il a un poids moléculaire estimé entre 340 et 370 kDa. La molécule de fibrinogène est une protéine hexamère faite de 3 chaînes différentes reliées entre elles : $A\alpha$, $B\beta$ et γ . Néanmoins il existe une autre forme de fibrinogène, le fibrinogène 420, qui représente 1 % du total plasmatique et de poids moléculaire 420 kDa. La chaîne α est alors remplacée par une chaîne αE plus longue de 236 acides aminés. La molécule de fibrinogène est formée de 2 sous-unités identiques reliées par des ponts disulfures, donnant à la molécule une forme de fibre contenant 3 globules : un central (domaine E) et deux distaux (domaines D). Chez l'Homme, la molécule entière contient 2964 acides aminés : 610 acides aminés pour la chaîne $A\alpha$, 461 pour la chaîne $B\beta$ et 411 pour la chaîne γ . Enfin le facteur I contient 4 chaînes polysaccharidiques [170].

Le centre de la protéine étant riche en glutamate, aspartate et tyrosine-O-sulfate, cette région est donc fortement négative ce qui permet au fibrinogène d'être hydrosoluble et aux diverses molécules de se répulser entre elles.

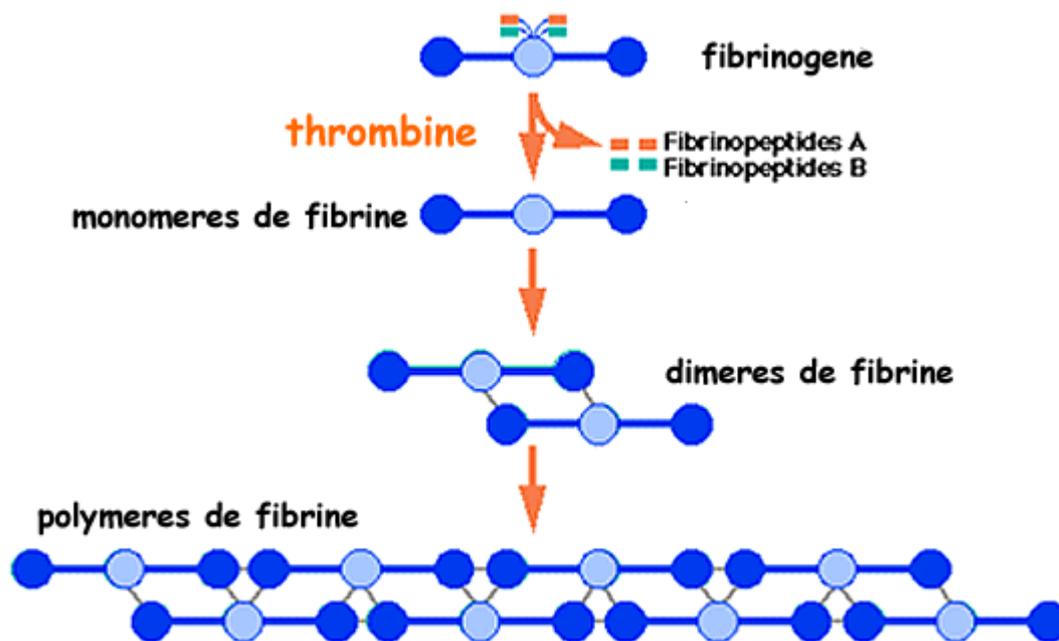
Il a été montré chez l'Homme que chaque chaîne est codée par un gène différent, respectivement *FGA* (*Fibrinogen chain Alpha*) (5 exons + 1 exon responsable de la chaîne αE), *FGB* (*Fibrinogen chain Beta*) (8 exons orientés dans le sens contraire de la transcription de *FGA* et *FGG*) et *FGG* (*Fibrinogen chain Gamma*) (10 exons) tous situés sur le chromosome 4q26-qter dans une région d'approximativement 50 kilobases. L'assemblage des chaînes s'effectue dans le réticulum endoplasmique avec la formation de molécules intermédiaires ($A\alpha\gamma$ ou $B\beta\gamma$), l'ajout de la troisième chaîne (respectivement $B\beta$ ou $A\alpha$) et la dimérisation en $(A\alpha B\beta\gamma)_2$. Le passage dans l'appareil de Golgi fait subir au dimère de nombreuses modifications telles que phosphorylation, hydroxylation ... Il est également à noter que les chaînes $B\beta$ et γ présentent à leur extrémité C-terminale un domaine homologue d'environ 250 acides aminés appelé FReD (*fibrinogen-related domain*) et qui est conservé dans diverses protéines chez plusieurs espèces animales [170].

La concentration plasmatique du fibrinogène est comprise entre 2 et 4 g/L chez l'Homme ; chez le Chien, elle semble également comprise entre 2,5 et 4 g/L. La demi-vie de cette molécule est d'environ 36 heures chez le Chien avec un turnover de 500 $\mu\text{g/mL/jour}$ [74].

b. Fibrine

La thrombine clive la partie amino-terminale des chaînes $A\alpha$ et $B\beta$, libérant par la même les fibrinopeptides A et B (en premier lieu A puis B) dans le globule central E, pour donner des monomères de fibrine ; ce clivage est permis par la rupture des ponts arginine-glycine. La nouvelle chaîne amino-terminale ainsi formée au niveau du domaine E se lie au site « a » de la partie carboxy-terminale d'une chaîne γ (domaine D) d'un autre monomère de fibrine. Cette interaction permet la formation d'un alignement de monomères : la protofibrille. Les régions carboxy-terminale des chaînes α interagissent entre elles formant des fibres épaisses. Enfin la polymérisation de la chaîne β avec un site b pour le moment inconnu conduit à l'accroissement en largeur des fibrilles amenant à la formation de fibres (Figure 5). Toutes les liaisons faibles et ioniques ainsi formées seront renforcées par l'action du facteur XIIIa qui crée des liaisons covalentes entre les divers polymères. Le rôle exact du fibrinogène 420 n'est toujours pas connu [182].

Figure 5. Représentation schématique de la formation de la fibrine à partir du fibrinogène
(d'après www.Tollefsen.wustl.edu)



Légende : Les cercles foncés représentent les globules distaux (domaines D), les cercles clairs le globule central (domaine E). La thrombine libère les fibropeptides A et B du domaine E. Le domaine E d'un monomère se lie au domaine D d'un autre monomère formant un dimère puis une protofibrille. La polymérisation des protofibrilles forme alors une fibre épaisse.

2. Facteur II

a. Prothrombine

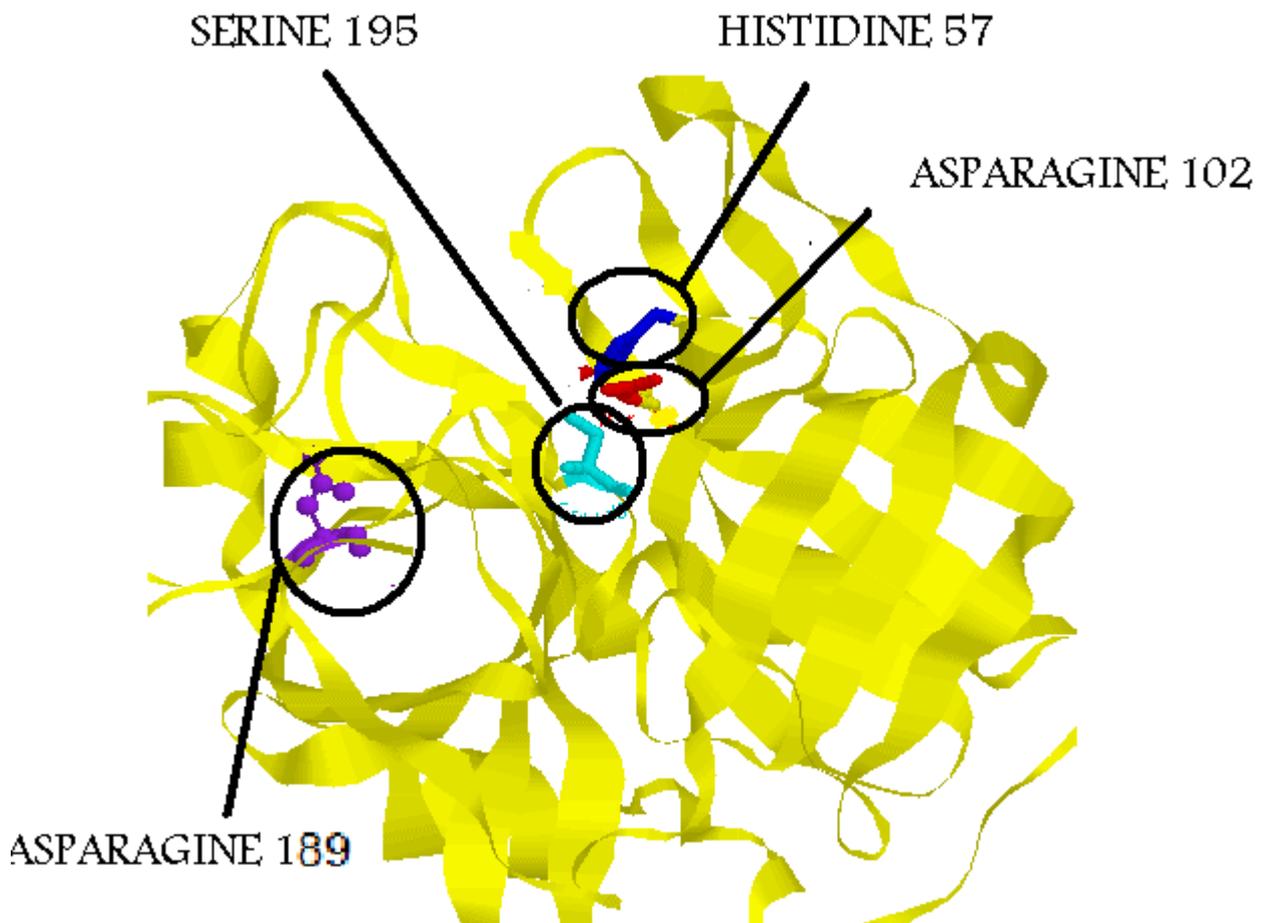
Le facteur II ou prothrombine est une protéine plasmatique qui est le précurseur inactif de la thrombine. Chez le Chien, la synthèse s'effectue au niveau des hépatocytes et nécessite la présence de vitamine K. La vitamine K intervient dans les modifications post-translationnelles au niveau du réticulum endoplasmique pour établir la structure de la molécule par l'intermédiaire des résidus glutamate γ -carboxylés (GLA). Ces GLA permettent la liaison au calcium et aux phospholipides, propriété indispensable pour une liaison avec le complexe prothrombinase. La

conversion de la prothrombine en thrombine nécessite la présence de calcium, du facteur Va, du facteur Xa et du facteur plaquettaire 3, qui forment un complexe appelé prothrombinase [170]. La protéine a un poids moléculaire de 70 kDa et une concentration plasmatique de l'ordre de 100 à 150 mg/L chez l'Homme et chez le chien. Sa demi-vie est d'environ 100 heures et son *turnover* est de 40 µg/mL/jour. Elle est formée de 3 boucles dues à la présence de ponts disulfures. Elle est composée de 579 acides aminés. Le gène codant pour la prothrombine est situé sur le chromosome 11 en position 11p11-q12 chez l'Homme [170].

b. Thrombine

La thrombine est formée de deux chaînes, une chaîne légère de 36 acides aminés et une chaîne lourde de 259 acides aminés dont la formation est consécutive au clivage de la prothrombine. C'est au niveau de la chaîne lourde que se trouve le site actif de la molécule ; celui-ci est composé de 4 acides aminés : Sérine 195 – Histidine 57 – Asparagine 102 – Asparagine 189 (Figure 6). Ce site est protégé par une boucle Tyr60A-Pro60B-Pro60C-Trp60D (YPPW) dont la structure est présente dans les 11 thrombines retrouvées dans le monde animal. Une deuxième boucle Trp148 s'oppose à YPPW et joue un rôle dans la coagulation. Après activation, la thrombine se détache des phospholipides auxquels elle s'est liée au cours de l'activation de la prothrombine par le facteur Xa [170].

Figure 6. Modélisation de la structure de la thrombine chez l'Homme [49]



Légende : Les résidus entourés interviennent dans le site actif de l'enzyme (Histidine 57, Asparagine 102, Asparagine 189, Sérine 195)

Elle active les facteurs V, VIII, XI et XII mais de manière antagoniste a également un effet anticoagulateur par sa liaison avec la thrombomoduline à l'origine d'une activation de la protéine C. La thrombine joue un rôle dans la réponse inflammatoire et la cicatrisation ; elle a en effet un rôle chimiotactique sur les monocytes et les fibroblastes. Elle active également les plaquettes et les neutrophiles qui relarguent alors de nombreuses molécules dont des cytokines, des facteurs de croissance et des facteurs chimiotactiques. Il existe notamment 5 récepteurs à la thrombine au niveau des plaquettes : PAR-1 (*Protease Activated Receptor 1*), PAR-4 (*Protease Activated Receptor 4*), glycoprotéine Ib, glycoprotéine V et un « site de liaison de haute affinité ».

L'inactivation de la thrombine est permise par l' α 2-macroglobuline, HC II (*Heparin Cofactor II*) et par l'antithrombine III. La modification du site actif de la thrombine lors de la liaison de la

thrombine à la fibrine polymérisée entraîne une inhibition plus efficace de celle-ci par l'antithrombine III.

3. Facteur III

Le facteur III ou thromboplastine tissulaire (ou thrombokine ou facteur tissulaire) est une molécule potentiellement synthétisée par tous les tissus. La thromboplastine permet l'activation du facteur VII et est à l'origine de la voie extrinsèque. Elle est présente sur la surface des vaisseaux sanguins et sa quantité augmente en cas d'inflammation.

La thromboplastine est une glycoprotéine à simple chaîne de 261 ou 263 acides aminés et de poids moléculaire de 45 kDa pour la molécule glycosylée. La structure du facteur III est organisée en 3 domaines [170] :

- un domaine extracellulaire qui permet les interactions avec le facteur VII et qui est formé de 2 domaines de type III fibronectine,
- un domaine transmembranaire,
- un domaine intracellulaire de 21 acides aminés.

Le gène de la thromboplastine tissulaire a été localisé sur le chromosome 1 chez l'Homme (1p21) alors qu'il a été localisé sur le chromosome 3 de la Souris [170].

C'est le seul facteur de la coagulation qui n'est ni activé ni inactivé par protéolyse. La thromboplastine est présente sous forme de dimère à la surface des cellules. Un flux calcique entraîne la dissociation de ce dimère à l'origine d'un changement de structure quaternaire de la molécule qui lui confère la possibilité de s'associer au facteur VII.

Aucun déficit congénital en ce facteur n'a jamais été décrit.

4. Facteur IV

Le facteur IV correspond au calcium qui intervient en de multiples étapes au cours de la coagulation. Le calcium est un métal alcalino-terreux qui correspond à l'élément numéro 20 dans la classification de Mendeleïev ; sa masse atomique est de 40,08 uma (unité de masse atomique) et sa densité de 1,54. Il participe à un grand nombre de phénomènes physiologiques tels que la

synthèse osseuse ou les contractions musculaires. Quatre vingt dix neuf pour cent du calcium est stocké sous forme d'hydroxyapatite dans la masse inorganique de l'os, 0,9 % est séquestré dans la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique et 0,1 % dans le liquide extracellulaire dont 50 % sous forme ionisée (Ca^{2+}) qui est la forme biologiquement activé, 45 % lié aux protéines et 5 % complexé (Ca-citrate, Ca-lactate, Ca-bicarbonate, Ca-phosphate).

Une hypocalcémie responsable d'un défaut de coagulation sanguine entraînerait la mort de l'animal et ne se rencontre donc pas en pratique.

5. Facteur V

Le facteur V ou proaccéléline (ou AC-globuline (*globulin accelerans*)) est une molécule de poids moléculaire égal à 330 kDa. Sa concentration plasmatique est, chez le chien, comprise entre 5 et 12 $\mu\text{g/mL}$, sa demi-vie est d'environ 25 heures et son turnover de 10 $\mu\text{g/mL/jour}$. La proaccéléline est synthétisée au niveau des hépatocytes et des macrophages.

Elle existe sous 2 formes circulantes : une forme monocaténaire de poids moléculaire de 330 kDa et une forme, dont la partie centrale a été excisée, de poids moléculaire compris entre 200 et 280 kDa. La proaccéléline est présente dans le plasma et dans les granules α des plaquettes [170].

Le gène codant pour la proaccéléline est localisé chez l'Homme au niveau du chromosome 1 en position 1q23.

Le facteur V est activé en accéléline initialement par le facteur Xa et par de faibles concentrations du facteur II. L'action procoagulante du facteur V s'explique par l'activation provoquée de la prothrombine permise par l'action de la prothrombinase, complexe au sein duquel agit l'accéléline (ou facteur VI). Toutefois le facteur V se doit d'être activé par la thrombine pour que le complexe thrombinase se forme. La thrombine doit donc être initialement formée par le facteur Xa sans l'accéléline. Ce mécanisme permet une régulation du système : la thrombine étant formée uniquement par le facteur Xa lié aux phospholipides, elle peut être inhibée par l'antithrombine III ou un autre inhibiteur avant l'activation de la proaccéléline. Le facteur V a également une action anticoagulante ; c'est en effet un cofacteur de la protéine C activé qui inhibe l'activation du facteur VIII [170].

L'accéléline est inhibée par la protéine C activée qui la clive en 2 sites : Arginine 306 et arginine 506.

6. Facteur VI

Le facteur VI ou accéléline est la forme activée du facteur V et correspond donc au facteur Va.

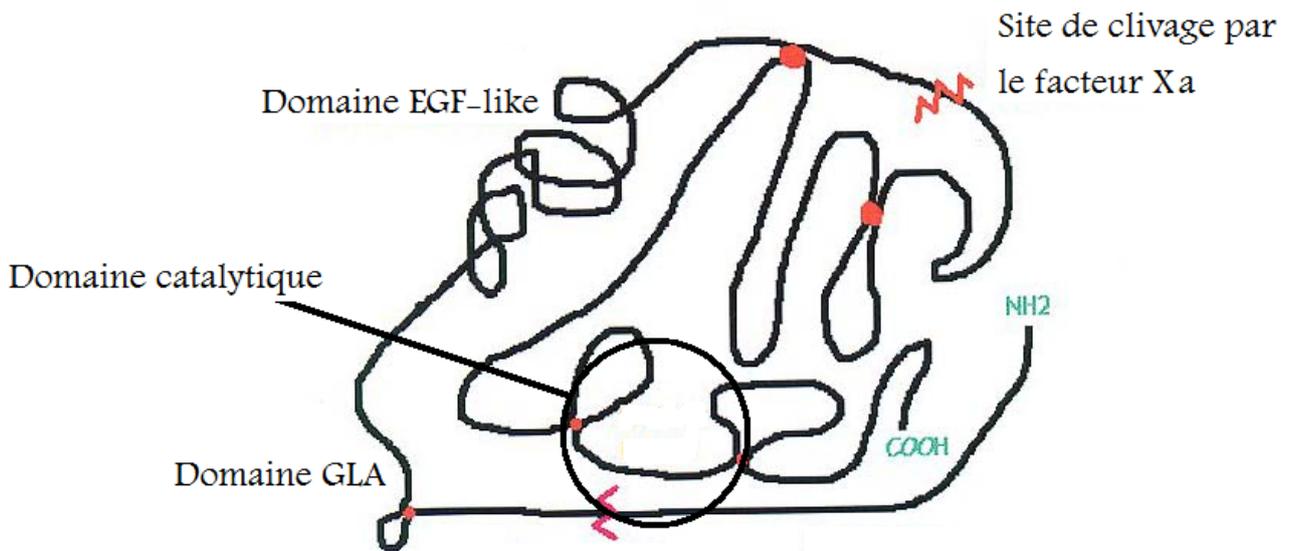
7. Facteur VII

Le facteur VII ou proconvertine est une glycoprotéine plasmatique de 63 kDa, formée d'une seule chaîne de 406 acides aminés. La concentration plasmatique est de 1 µg/mL, sa demi-vie de 5 heures et son *turnover* de 2 heures. La proconvertine est synthétisée au niveau des hépatocytes et sa synthèse dépend de la vitamine K.

Le facteur VII possède un domaine GLA (domaine riche en acides γ -carboxyglutamiques), une partie hydrophobe, deux domaines EGF-like (*Epidermal Growth Factor-like*) et un domaine sérine protéase homologue à celui de la trypsine (Figure 7). Chez l'Homme, le gène de la proconvertine est situé sur le chromosome 13 en position 13q33 à seulement 2,8 kilobases de celui du gène codant pour le facteur X [170].

L'activation du facteur VII est permise par l'action conjointe du facteur tissulaire et du calcium qui crée une zone de clivage entre l'arginine 152 et l'isoleucine 153. Le facteur VII est également activé par les facteurs Xa, IXa et XIIa et l'hepsine. Le complexe Facteur III – Facteur VIIa est à l'origine d'une auto-activation du facteur VII [92]. Enfin le facteur VII peut être activé par une autre protéase, la *Plasminogen Activator-Activating Protease* (FSAP) ou *Plasma Hyaluronan Binding Protein* (PHBP) dont l'activité est augmentée en présence de matériel intracellulaire dont les glycosaminoglycanes (héparine, hyaluronase) ce qui constitue une voie parallèle d'activation intrinsèque de la coagulation [168].

Figure 7. Structure protéique du facteur VII



Légende : le facteur VII possède plusieurs domaines importants fonctionnellement : un domaine EGF-like, un domaine catalytique et un domaine GLA (domaine riche en acide γ -carboxyglutamique). Le schéma indique également le site de clivage par le facteur Xa.

Le complexe facteur tissulaire – facteur VIIa active le facteur X dans la voie extrinsèque.

Le facteur VIIa est inhibé par :

- le complexe TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*)-Xa qui amène à la formation d'un complexe TFPI-Xa-III-VIIa,
- l'annexine V,
- l'antithrombine se lie au complexe III-VIIa et le dissocie avant de s'associer avec le facteur VIIa empêchant ainsi toute réaction avec le facteur III tissulaire,
- le facteur plaquettaire 4,
- la sphingosine.

8. Facteur VIII

Le facteur VIII:C (ou facteur antihémophilique) est une glycoprotéine composée de deux chaînes, une chaîne lourde de poids moléculaire variant entre 90 000 et 210 000 Daltons (Da) et une chaîne légère d'un poids moléculaire de 80 000 Da, stabilisée par un ion métallique de cuivre, dont la chélation avec le calcium inhibe l'activité du facteur VIII:C. *In vivo*, ce complexe circule lié dans le plasma avec le vWF ($K_d < 0,5$ nmol/L) avec une stoechiométrie d'une molécule de facteur VIII:C reliée à un monomère de ce dernier. Le site de liaison avec le vWF se trouve au niveau de la chaîne légère certainement avec un pentadécapeptide en partie N-terminale. En réalité le facteur VIII:C est très instable dans la circulation sanguine où l'exposition à de nombreuses réactions enzymatiques provoquent sa protéolyse c'est la raison pour laquelle il est associé au vWF. D'autre part l'interaction facteur VIII-vWF empêche la liaison prématurée du facteur VIII sur les composants du complexe activateur du facteur X (l'affinité du facteur VIII est cent fois plus importante pour le vWf que pour le facteur IX). Enfin le vWF stabilise la structure hétérodimérique du facteur VIII. *In vivo*, le ratio facteur VIII / vWF est de 1/50 [170].

Le facteur VIII est un complexe composé du facteur VIII:C, du vWF mais également d'un facteur VIII antigénique (VIII:Ag) de gros poids moléculaire à l'origine de l'antigénicité globale mais dont on sait peu de choses [183].

L'analyse de la séquence d'acide aminé du facteur VIII:C montre la répétition de certaines séquences : une séquence A d'environ 350 acides aminés se répète trois fois ainsi qu'une séquence C deux fois (structure A1-a1-A2-B-a2-a3-A3-C1-C2).

Il est synthétisé au niveau des hépatocytes mais aussi dans d'autres organes comme la rate ou le rein. L'ARNm du facteur VIII:C a été retrouvé également au niveau des cellules lymphoïdes. Toutefois la plupart des études considèrent la rate comme un organe de stockage du facteur VIII.

La concentration plasmatique est comprise entre 50 et 150 ng/mL chez le Chien ; sa demi-vie, *in vivo*, est de 6 à 14 heures.

Il a été montré chez l'Homme que le taux sanguin d'activité du facteur VIII peut être modifié par un certain nombre de facteurs internes ou externes [183] :

- l'exercice musculaire provoque une augmentation rapide mais transitoire du facteur VIII:C dont le niveau d'activité initiale peut se trouver doubler ou tripler (libération de

facteur VIII par la rate ?). Contrairement à l'Homme il semblerait que chez le Chien l'exercice n'augmente pas la teneur plasmatique en facteur VIII [212],

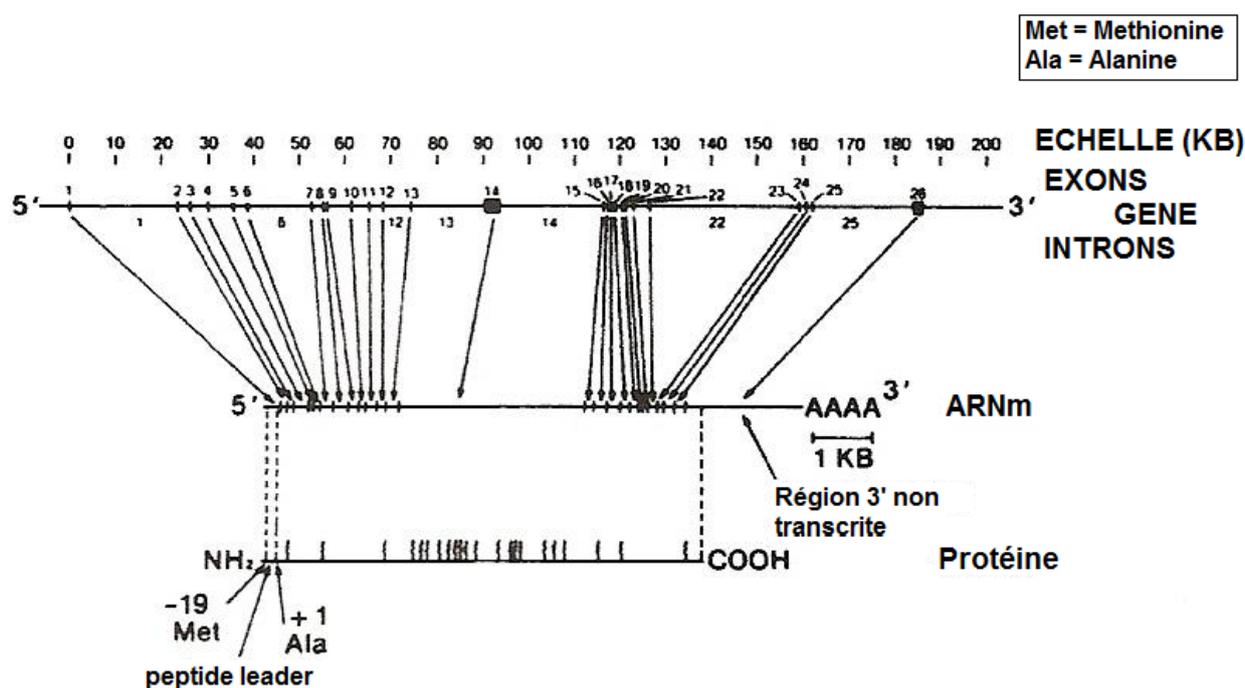
- l'injection d'adrénaline provoque une augmentation identique, inhibée par les β -bloquants,
- la stimulation du système nerveux central (électrochoc) ou celle de l'hypothalamus entraîne une augmentation de l'activité du facteur VIII:C,
- la fièvre, les interventions chirurgicales, la stase veineuse, la gestation, les progestatifs de synthèse, les traitements anticoagulants, les corticoïdes sont également associés à une élévation de l'activité du facteur VIII:C.

Chez le Chien, l'activité du facteur VIII augmente avec l'âge de l'animal. Ainsi il a été montré que cette activité est plus faible chez le chiot [16]. Le stress est également à l'origine d'une augmentation de cette activité suite à la splénocontraction induite [91]. Enfin une étude sur 12 chiennes a montré une augmentation significative de l'activité du facteur VIII à partir de la troisième semaine de gestation et ce jusqu'à la mise-bas [131].

Le gène intervenant dans la synthèse du facteur VIII est situé à l'extrémité du bras long du chromosome X chez tous les mammifères en position Xq28 [177]. Il comprend, chez l'Homme, près de 186 000 paires de bases ce qui représente environ 0,1 % du chromosome X. L'ARN messager (ARN_m) est constitué à partir de 26 exons, de taille variant entre 69 et 3 106 paires de bases. Les 25 introns séparant les exons ont, au niveau de l'ADN, une taille variant de 207 à 32 400 paires de base. Le gène complet est donc constitué d'environ 9 kilobases d'exons et de 177 kilobases d'introns [222].

La traduction de l'ARN_m commence probablement au niveau du 170^{ème} nucléotide du côté 5' de la molécule (Figure 8). Après une séquence GATAAA requise pour initier la transcription (séquence « ATA »), cette région non traduite est suivie d'une région codant pour 2 351 acides aminés comprenant notamment 19 acides aminés hydrophobes correspondant au peptide-signal qui est ensuite excisé lors de la maturation protéique. Enfin la région non traduite du côté 3' contient 1 805 nucléotides de long et contient des répétitions AATAAA et CATTG puis se termine par une queue poly-A de 1 kilobases.

Figure 8. Facteur VIII : De l'ADN à la protéine [222]



Légende : la figure montre la transcription de l'ADN du gène codant pour le facteur VIII en ARNm puis la traduction de celui-ci en protéine.

La molécule est ensuite protéolysée dans les hépatocytes ce qui produit une molécule bicaténaire.

L'activation du facteur VIII est permise par le facteur Xa et la thrombine qui le clive en 3 sites. La thrombine rompt le facteur VIII en arginine 1689 de la chaîne légère et en arginine 372 et arginine 740 de la chaîne lourde. Quant au facteur Xa, il le clive en arginine 336, arginine 372 et arginine 740. Ce clivage permet la libération de la partie centrale de 170 kDa et la formation d'un tripeptide actif. Il est à noter que le facteur VIIIa obtenu par clivage par le facteur Xa aurait une activité moindre que celui obtenu par la thrombine.

Le facteur VIIIa est un cofacteur du facteur IXa, des phospholipides (dont le *Platelet Factor 3*) et du calcium. Le complexe ainsi formé permet l'activation du facteur X.

L'inhibition du facteur antihémophilique est permise par la plasmine et par le complexe PCa-SV (*Protein C activator*).

9. Facteur IX

Le facteur IX (ou facteur Christmas) est une sérine protéase de 62 kDa de poids moléculaire. Sa concentration plasmatique est de 4 µg/mL chez le chien, sa demi-vie est de 20 heures et son *turnover* est de 2 µg/mL/jour. Il intervient au sein du complexe ténase (VIIIa-IXa-PF3-Ca) pour activer le facteur X. Sa synthèse a lieu au niveau des hépatocytes et est vitamine K-dépendante. Il est constitué d'un domaine GLA, de 2 domaines EGF, d'un domaine d'activation et d'un domaine sérine protéase [170].

Le gène codant pour le facteur IX est présent, chez l'Homme, sur le chromosome X en Xq26-q27. Il occupe 33,5 kilobases et comporte 8 exons.

Le facteur IX est clivé par le facteur XIa en une molécule, le facteur IXa, de 2 chaînes réunies par des ponts disulfures. Il peut également être activé par le facteur VIIa, la kallikréine ou encore le facteur Xa. Le facteur IX est en compétition avec le facteur X pour le site actif du facteur VIIa.

Le facteur IXa est inhibé par l'antithrombine III. La transformation du facteur IX en IXa est inhibée par la protéase nexine II [170].

10. Facteur X

Le facteur X (ou facteur Stuart-Prower) est une sérine protéase vitamine K-dépendante de poids moléculaire de 59 kDa, synthétisée dans le foie sous forme d'un précurseur de 488 acides aminés. Avant la sécrétion, 40 acides aminés sont excisés et les 11 premiers acides glutamiques sont carboxylés. Il en résulte un zymogène à deux chaînes : une chaîne légère de 139 acides aminés et une chaîne lourde de 306 acides aminés reliée par un pont disulfure [170].

Sa concentration plasmatique est comprise entre 7 et 17 mg/L chez l'Homme et est de 5 mg/L chez le Chien, sa demi-vie est de 65 heures et son *turnover* de 6 µg/mL/jour.

Chez l'Homme le gène a été localisé sur le chromosome 13 en position 13q34 et contient 9 exons.

L'activation du facteur X est la première réaction de la voie commune de la coagulation. Le facteur X peut être clivé en facteur Xa :

- par la voie intrinsèque par l'action du complexe VIIIa-IXa-PF3-Ca,
- par la voie extrinsèque par l'action du complexe IIIa-VIIa-Ca.

Le rôle du facteur Xa est de former avec le facteur Va, le PF3 et le calcium le complexe prothrombinase à l'origine de la formation de thrombine. Le facteur Xa est également un activateur de la protéine C [170].

Le facteur X est inhibé par l'antithrombine III et par TFPI (*Tissu Factor Pathway Inhibitor*).

11. Facteur XI

Le facteur XI ou *plasma thromboplastin antecedent* ou facteur Rosenthal, est une glycoprotéine formée de 2 chaînes et dont le poids moléculaire est de 200 kDa chez le Chien (160 kDa chez l'Homme). Chez le Chien, sa concentration plasmatique est de 4 µg/mL, sa demi-vie de 65 heures et son *turnover* est inférieur à 2 µg/mL/jour. Il est synthétisé par les hépatocytes. Il comporte 4 domaines dits *apple* : A1 à A4, qui sont les sites d'interaction avec les différents ligands. Le facteur XI circule dans le plasma en complexe avec le HMW-kininogène (kininogène de haut poids moléculaire) afin de faciliter sa liaison avec les surfaces négatives et son interaction avec le facteur XIIa. Il existe aussi une forme de facteur XI plaquettaire chez l'Homme qui représente 0,5 % de son activité totale ; son poids moléculaire est de 220 kDa et il est dû à l'épissage alternatif du gène (absence de l'exon V). On retrouve l'ARNm de ce facteur XI au niveau des mégacaryocytes et des plaquettes [170].

Le gène codant pour le facteur XI se trouve sur le chromosome 4 en position 4q35 chez l'Homme. Il comprend 16 exons codant pour la synthèse d'une protéine de 607 acides aminés dont la dimérisation est nécessaire pour une biosynthèse normale.

Le facteur XI est essentiellement activé par la thrombine. En effet, la coagulation est déclenchée par le facteur III suite à la présence d'une brèche vasculaire ce qui induit les activations consécutives du facteur VII, du facteur X et pour finir de la prothrombine par la voie extrinsèque. La thrombine active alors les facteurs V et VIII ce qui par rétroactivation permet l'activation du facteur XI ou facteur XIa [170].

Le facteur XI possède également une action antifibrinolytique par son activation du TAFI (*Thrombin Activator Fibrinolysis Inhibitor*).

12. Facteur XII

Le facteur XII ou facteur Hageman est une glycoprotéine qui s'autoactive au contact de surfaces chargés négativement. Chez l'Homme c'est une glycoprotéine de 80 kDa dont la demi-vie plasmatique est de 60 heures. Sa concentration plasmatique est d'environ 4 µg/mL et son *turnover* est inférieur à 2 µg/mL/jour. Le facteur intervient dans la voie intrinsèque de la coagulation et active le facteur XI et la prékallikréine [170].

Le facteur XII joue également un rôle de promoteur dans l'activation du complément, dans l'inflammation, dans la fibrinolyse et dans les modifications de perméabilité vasculaire [22].

Le gène humain codant pour le facteur XII a été localisé que le chromosome 5 en position 5q35.

Le facteur Hageman est activé par la prékallikréine en α XIIa puis un deuxième clivage par la kallikréine le transforme en β XIIa.

13. Facteur XIII

Le facteur XIII ou facteur stabilisateur de la fibrine est une transglutaminase qui agit sur les polymères de fibrine en y créant des liaisons covalentes afin de les renforcer et de les stabiliser en les rendant notamment moins sensible à la plasmine. Sa synthèse est assurée par les hépatocytes et les mégacaryocytes. Le facteur XIII est une glycoprotéine de 320 kDa dont la concentration plasmatique est de 10 µg/mL, la demi-vie de 150 heures et le *turnover* de 3 µg/mL/jour chez l'Homme. Chez l'Homme, sa concentration plasmatique augmente avec l'âge, le sexe (femme > homme) et le tabac. Il circule sous la forme d'un tétramère constitué de deux sous-unités A et de deux sous-unités B.

Chez l'Homme, le gène codant pour la partie A est présent sur le chromosome 6 en position 6p24-25 et comporte 15 exons. Quant au gène codant pour la partie B, il est intégré au chromosome 1 en position 1q32-32.1 et comporte 12 exons [170].

L'activation du facteur XIII est permise par la thrombine, son action étant toutefois dépendante du calcium. Le fibrinogène est aussi un promoteur de la formation de XIIIa.

Le facteur XIIIa permet la création de ponts ϵ -(γ -glutamyl)lysine, qui est une liaison covalente responsable en particulier du « *cross-linking* ». Le « *cross-linking* » est la création de liaison covalente entre les monomères de fibrine et d'autres molécules telles que la fibronectine, l' α 2-antiplasmine ou le collagène. Le facteur XIIIa favorise ainsi la résistance mécanique de la fibrine. Il joue également un rôle dans le maintien de la grossesse chez la femme.

14. Prékallicroïne

La prékallicrine ou facteur Fletcher est une glycoprotéine à simple chaîne de 85 kDa dont le rôle est d'activer le facteur XII et plus faiblement le facteur IX. Sa concentration plasmatique est de 25 à 50 mg/L chez l'Homme. Chez le Chien, sa demi-vie est de 35 heures. Elle est synthétisée au niveau du foie. La forme active comporte deux types de chaîne : une chaîne lourde et une chaîne légère. Il circule dans le plasma liée au HMW-kininogène par sa chaîne lourde, la chaîne légère contenant le site actif [185].

Chez l'Homme, le gène codant pour la prékallicrine est situé sur le chromosome 4 en position 4q34-35 et est constitué de 22 kilobases [170].

Son activation est permise par l'action de α XIIa et β XIIa qui donne une molécule de kallicrine à 2 chaînes. La kallicrine active alors le facteur XII à une vitesse mille fois supérieure à l'autoactivation ; elle intervient sur l'activation du HMW-kininogène et du facteur VII. Enfin elle joue aussi un rôle dans la fibrinolyse par son activation de la pro-urokinase en urokinase.

15. HMW(High Molecular Weight)-kininogène

Le HMW-kininogène (HMWK), ou facteur Fitzgerald, Flaujeac ou Williams, est une protéine de poids moléculaire égal à 120 kDa. Sa synthèse a lieu au niveau du foie. Sa concentration plasmatique est comprise entre 60 et 90 mg/L chez l'Homme. Chez le Chien, sa demi-vie est d'environ 156 heures.

Le gène codant pour la HMW-kininogène est localisé, chez l'Homme, sur le chromosome 3 en position 3q27 [170].

Le HMWK est clivé, par la kallibréine, en kininogènes qui sont représentés par la bradykinine et une chaîne légère qui se lie au facteur XI. Un clivage lent est aussi possible par l'action de α XIIa. La bradykinine est un nonapeptide qui est le stimulant physiologique le plus puissant du tPA (*tissue Plasminogen Activator*) et qui augmente la sécrétion de prostacycline par les cellules endothéliales. Les kininogènes sont également des inhibiteurs de l'activation plaquettaire et de la thrombine [170].

Le facteur XIa, par le clivage de la chaîne légère, entraîne l'inhibition du kininogène.

16. Autres acteurs intervenant dans la coagulation

a. Facteurs permettant la coagulation

α . Facteur plaquettaire 3

Le facteur plaquettaire 3 (PF-3) est une phospholipoprotéine chargée négativement présente au sein de la membrane plaquettaire qui, en présence de calcium, permet la fixation de nombreux facteurs notamment au sein du complexe prothrombinase [170].

β . Facteur plaquettaire 4

Le facteur plaquettaire 4 (PF-4) ou facteur antihéparinique est un facteur contenu au sein des granules α des thrombocytes. Il est libéré lors du *release* plaquettaire (sécrétion plaquettaire). Il permet l'inhibition de l'héparine [170].

b. Inhibiteurs de la coagulation [170]

α . Antithrombine III

L'antithrombine III est le principal agent inhibiteur de la coagulation retrouvé dans le plasma. C'est une α_2 -glycoprotéine synthétisée par le foie. Chez l'Homme, sa concentration plasmatique est comprise entre 180 et 300 mg/L et sa demi-vie est d'environ 60 heures.

Chez l'Homme, le gène codant pour l'antithrombine a été localisé sur le chromosome 1 en position 1q23-25 et comporte 7 exons. Les glucocorticoïdes stimulent son expression alors que les œstrogènes la diminuent [170].

Cette molécule est à l'origine de la désactivation des facteurs IIa, IXa, Xa, XIa et XIIa. Elle agit également contre la plasmine et la kallikréine. Son action est potentialisée par la présence d'héparine. L'activité de l'antithrombine III chez le Chien et chez le Chat équivaut à environ 65 % de l'activité de l'antithrombine III équine [170].

β. Héparine

L'héparine est une molécule faisant partie des glycosaminoglycanes aux propriétés anticoagulantes très puissantes. Elle agit comme un démultiplicateur de l'action de l'antithrombine III avec laquelle elle interagit. Elle est présente au niveau des tissus conjonctifs chez l'Homme et chez les animaux. Elle est notamment sécrétée par les mastocytes lors de la réaction inflammatoire [170].

γ. Protéine C

La protéine C est une sérine-protéase vitamine-K dépendante de poids moléculaire égal à 62 kDa. Elle est synthétisée par le foie et sa demi-vie est d'environ 16 heures. Elle circule sous forme inactive dans le plasma à une concentration comprise entre 2,7 et 6 mg/L et est activée par le complexe thrombine/thrombomoduline, sur la surface des cellules endothéliales, en protéine C activée. Le facteur Xa peut également activer la protéine C.

Le gène codant pour la protéine C est localisé chez l'Homme sur le chromosome 2 en position 2q13-14 [170].

La protéine C activée permet le clivage des facteurs Va et VIIIa. La protéine C activée diminue donc la formation de thrombine et par la même diminue la formation de TAFI (*Thrombin-Activable Fibrin Inhibitor*) et donc augmente la fibrinolyse. La protéine S agit comme un cofacteur de la protéine C activée et augmente la vitesse de dégradation du facteur Va [170].

δ. Protéine S

La protéine S est une glycoprotéine à simple chaîne vitamine-K dépendante et de poids moléculaire égal à 70 kDa. Elle est synthétisée et sécrétée par les cellules endothéliales puis se lie à leur surface. Elle est complexée à 60 % dans le plasma par la *C4b Binding Protein* sous une forme qui la rend inactive.

Chez l'Homme c'est le chromosome 3 en position 3q11.1-11.2 qui porte le gène codant pour la protéine S [170].

La protéine S est un cofacteur de la protéine C activée qui possède 3 fonctions :

- ← - cofacteur de l'inactivation des facteurs Va et VIIIa,
- ← - inhibition de l'activité de la prothrombinase par liaison avec les facteurs Va et Xa,
- ← - inhibition de l'activité du facteur X par interaction avec le facteur VIII.

La thrombine permet l'inactivation de la protéine S par clivage.

ε. Inhibiteur de la C'1 estérase

L'inhibiteur de la C'1 estérase est une glycoprotéine plasmatique de 104 kDa qui possède une activité inhibitrice vis-à-vis des facteurs XIa et XIIa, de la kallibréine et de la plasmine. Il est également présent au sein des granules α plaquettaire et est relargué lors de leur activation.

Le gène codant pour l'inhibiteur de la C'1 estérase est situé sur le chromosome 11 et comporte 8 exons chez l'Homme.

La thrombine et la plasmine ont un effet inhibiteur sur cette molécule.

ζ. α_1 -antitrypsine

L' α_1 -antitrypsine est une α -globuline présente dans le plasma et les plaquettes. C'est l'inhibiteur majeur de la trypsine mais il possède également un effet inhibiteur sur la chymotrypsine, l'urokinase, la plasmine et les facteurs Xa et XIa.

η. α_2 -macroglobuline

L' α_2 -macroglobuline est une glycoprotéine estérase plasmatique de 725 kDa qui inhibe la thrombine, la plasmine et la kallibréine. Elle représente 25 % de la capacité plasmatique d'inhibition de la thrombine. Chez l'Homme sa concentration plasmatique est comprise entre 1,3 et 3,3 g/L. Elle est synthétisée par les cellules endothéliales sur lesquelles elle reste liée.

L' α_2 -macroglobuline se lie avec la thrombine qui devient alors incapable de se lier avec le fibrinogène et elle entre en compétition avec l'antithrombine III. Le complexe α_2 -macroglobuline/thrombine est capable de cliver le facteur VIII. Enfin l' α_2 -macroglobuline est un faible inhibiteur de la protéine C activé.

θ. α_2 -antiplasmine

L' α_2 -antiplasmine est une α_2 -glycoprotéine capable d'inactiver la plasmine et l'urokinase mais aucun autre facteur de la coagulation.

ι. Cofacteur II de l'héparine

Le cofacteur II de l'héparine forme un complexe covalent avec la thrombine à l'origine de son activité anticoagulatoire. Son action inhibitrice est favorisée par l'héparine à doses élevées, l'héparane et le dermatane sulfate. Il est synthétisé par le foie et sa concentration plasmatique est, chez l'Homme, d'environ 90 mg/L.

Les différents facteurs de la coagulation sont rassemblés dans le tableau 1

Tableau 1. Propriétés des facteurs de la coagulation chez l'Homme.

Facteur	Nom commun	Poids moléculaire (Dalton)	Taux plasmatique (µg/mL)	Demi-vie (heures)	Turnover (µg/mL/jour)	Lieu de biosynthèse	Dépendant de la vitamine K
I	Fibrinogène	340 000	2 500	123	500	Hépatocytes, mégacaryocytes	Non
II	Prothrombine	70 000	100	100	40	Hépatocytes	Oui
III	Thromboplastine tissulaire	45 000	0	-	-	Tous les tissus	Non
IV	Calcium	-	-	-	-	-	Non
V	Proaccéléline	330 000	5 – 12	25	10	Hépatocytes, macrophages	Non
VI	Accéléline	-	-	-	-	A partir du facteur V	Non
VII	Proconvertine	63 000	1	5	2	Hépatocytes	Oui
VIII	Facteur antihémophilique	1 – 2 000 000	7	10	25	Hépatocytes, cellules endothéliales et mégacaryocytes	Non
IX	Facteur Christmas	62 000	4	20	2	Hépatocytes	Oui
X	Facteur Stuart-Prower	59 000	5	65	6	Hépatocytes	Oui
XI	Facteur Rosenthal	200 000	4	65	< 2	Hépatocytes	Non
XII	Facteur Hageman	80 000	29	60	< 2	Hépatocytes	Non
XIII	Facteur stabilisateur de la fibrine	320 000	10	150	3	Hépatocytes, mégacaryocytes	Non
	Prékallikréine	85 000	-	35	-	Hépatocytes	Non
	Kininogène de haut poids moléculaire	120 000	-	156	-	Hépatocytes	Non

B. LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA COAGULATION

Il existe 2 voies parallèles d'initiation de la coagulation, qui se rejoignent lors de l'activation du facteur X : les voies intrinsèque et extrinsèque.

1. La voie intrinsèque de la coagulation

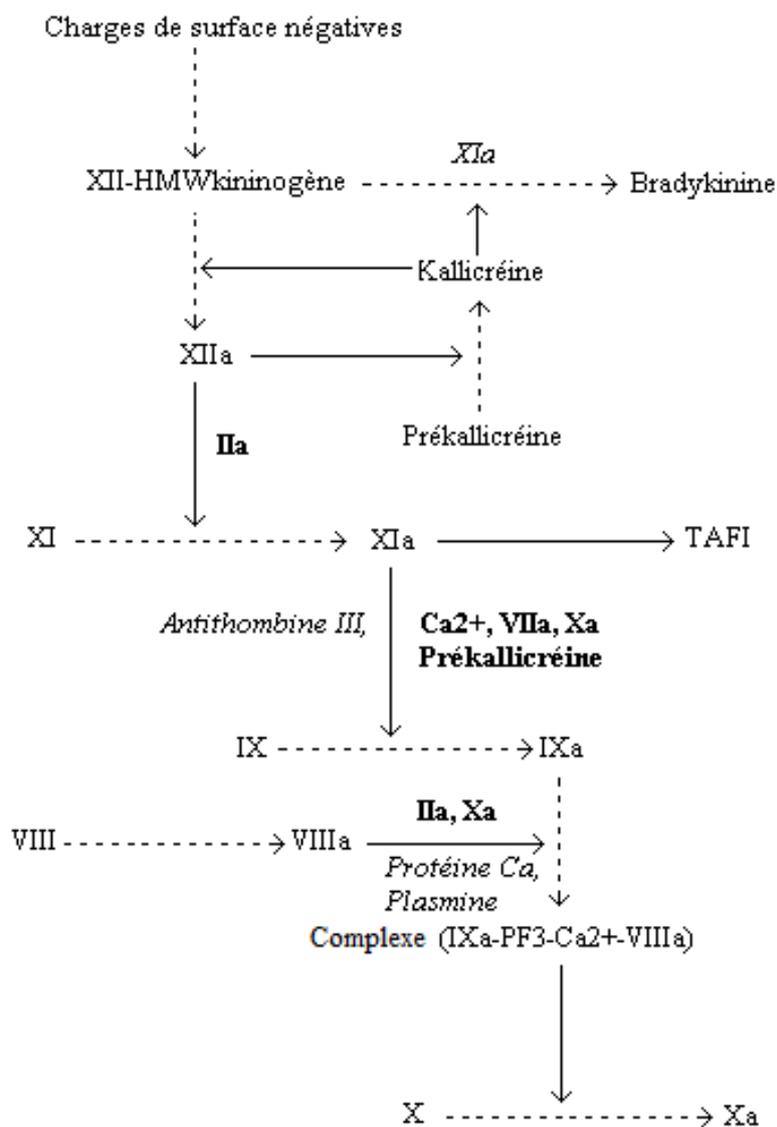
Tous les facteurs intervenant dans cette voie de coagulation sont des éléments appartenant au sang, à savoir des précurseurs plasmatiques ou plaquettaires. C'est le contact de ses éléments avec la paroi lésée qui est à l'origine de la voie intrinsèque de la coagulation.

Le facteur XII, à l'origine de cette voie, est activé par toute surface « mouillable », la présence d'une surface chargée négativement entraînant des changements de la conformation du facteur XII permettant son activation. Le facteur XIIa va alors permettre l'activation de la prékallicréine et du facteur XI. En parallèle le HMW-kininogène est également activé en bradykinine.

Le facteur XIa est à l'origine de la cascade enzymatique aboutissant à l'activation du facteur X. En effet l'activation du facteur IX et du facteur VIII permet la formation d'un complexe enzymatique permettant la transformation du facteur X en facteur Xa.

La voie intrinsèque de la coagulation est schématisée dans la figure 9.

Figure 9. Voie intrinsèque de la coagulation



Légende :

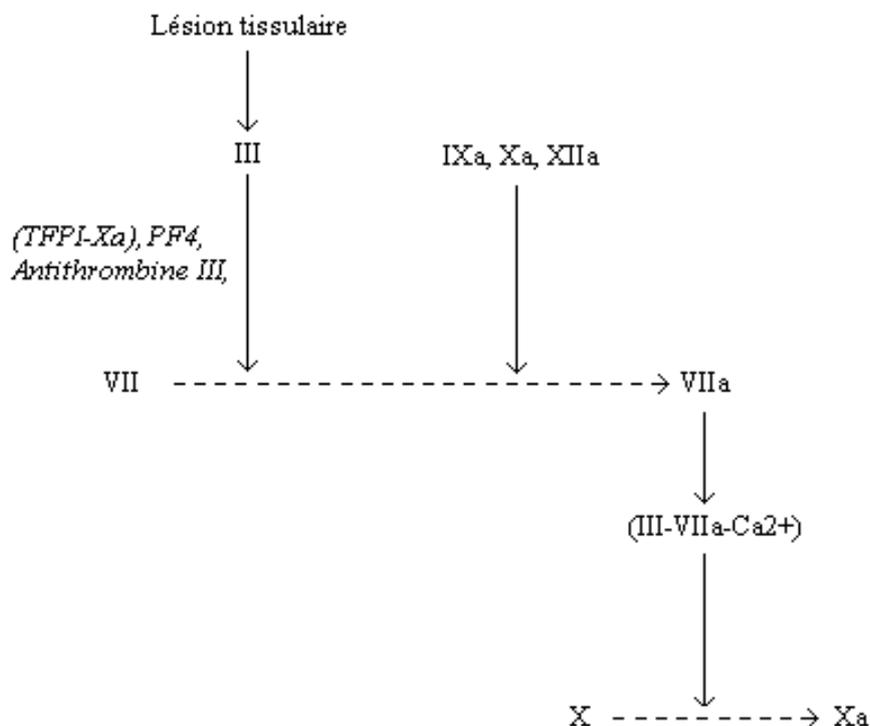
- - - - - > Indique l'activation d'un facteur .
- —————> Indique un effet agoniste d'un facteur sur l'autre ou un effet agoniste sur l'activation d'un facteur.
- Les autres facteurs intervenant dans la voie sont indiqués à côté des flèches pleines ; en gras les agonistes et en italique les antagonistes.
- VII, VIII, X, XI, XII = facteur VII, VIII, X, XI, XII (a = activé).
- TAFI = Inhibiteur de la Fibrinolyse Activé par la Thrombine.
- HWK-kininogène = kininogène de haut poids moléculaire.

2. La voie extrinsèque de la coagulation

La voie extrinsèque de la coagulation nécessite la présence du facteur tissulaire (ou facteur III) qui est libéré par les tissus lésés. La libération de cette substance permet alors l'activation du facteur VII. En se complexant avec le facteur III et le calcium, le facteur VIIa permet l'activation du facteur X (Figure 10).

La suite de la coagulation correspond à une voie commune suite à l'activation du facteur X.

Figure 10. La voie extrinsèque de la coagulation



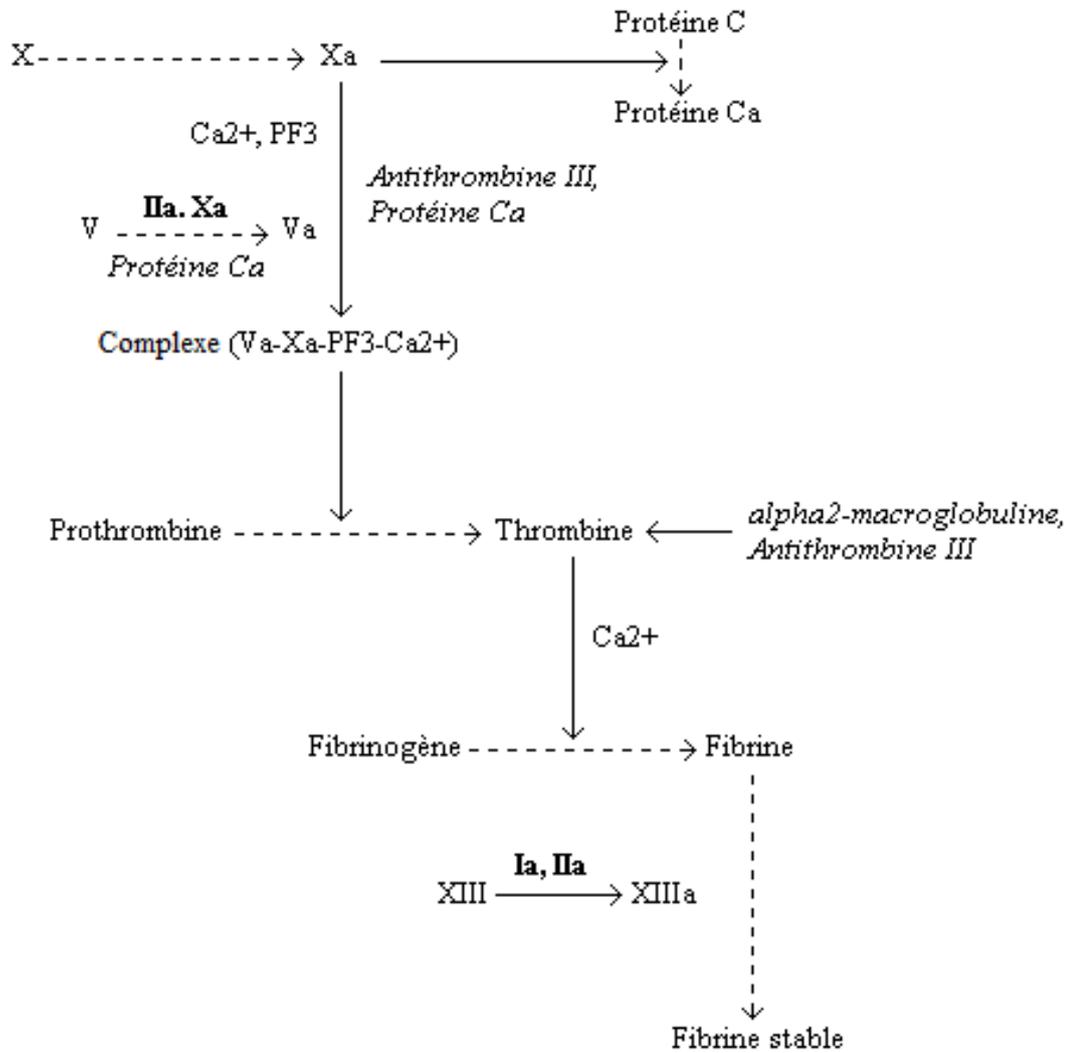
Légende :

- - - - -> Indique l'activation d'un facteur .
- —————> Indique un effet agoniste d'un facteur sur l'autre ou un effet agoniste sur l'activation d'un facteur.
- Les autres facteurs intervenant dans la voie sont indiqués à côté des flèches pleines ; en gras les agonistes et en italique les antagonistes.
- VII, VIII, X, XI, XII = facteur VII, VIII, X, XI, XII (a = activé).
- TAFI = Inhibiteur de la Fibrinolyse Activé par la Thrombine.
- HWK-kininogène = kininogène de haut poids moléculaire

TFPI = *Tissue Factor Pathway Inhibitor*

3. La voie commune de la coagulation

Figure 11. La voie commune de la coagulation



Légende :

- - - - - > Indique l'activation d'un facteur.
- ———> Indique un effet agoniste d'un facteur sur l'autre ou un effet agoniste sur l'activation d'un facteur.
- Les autres facteurs intervenant dans la voie sont indiqués à côté des flèches pleines ; en gras les agonistes et en italique les antagonistes.
- VII, VIII, X, XI, XII = facteur VII, VIII, X, XI, XII (a = activé).
- TAFI = Inhibiteur de la Fibrinolyse Activé par la Thrombine.
- HWK-kininogène = kininogène de haut poids moléculaire.

La voie commune de la coagulation permet la formation de fibrine à partir du facteur Xa. Suite à l'activation du facteur Xa, la prothrombine est transformée en thrombine par l'action du complexe prothombinase. La thrombine permet alors la formation de fibrine à partir du fibrinogène. Dans le même temps la thrombine active le facteur V en accélélerine, ce qui est à l'origine d'une augmentation de l'activation du facteur IIa. La formation de fibrine et de thrombine engendre l'activation du facteur XIII, qui crée alors des liaisons covalentes entre les diverses molécules de fibrine la rendant par là même plus stable (Figure 11) [194].

L'ensemble des mécanismes de la coagulation permet donc, à partir d'une lésion tissulaire, la formation d'un caillot sanguin grâce aux molécules de fibrine.

V. LA FIBRINOLYSE

La fibrinolyse est un processus physiologique à l'origine de la dissolution du caillot de fibrine par l'action d'une enzyme protéolytique. Elle intervient dans le cadre de l'hémostase pour éliminer le caillot formé. Elle s'effectue généralement entre la 60^{ème} et la 72^{ème} heure après la formation du caillot.

A. LES DIFFÉRENTS ACTEURS DE LA FIBRINOLYSE

1. Plasminogène

Le plasminogène est une β -globuline à chaîne simple, précurseur de la plasmine, de poids moléculaire égal à 88 kDa. Il est synthétisé par le foie, sa concentration plasmatique est d'environ 2,4 $\mu\text{mol/L}$ et sa demi-vie de 2,2 jours. Le plasminogène forme des complexes avec le fibrinogène et la fibrine durant la formation du caillot par sa forte affinité pour la lysine, ce qui y permet son incorporation.

Chez l'Homme, le gène codant pour le plasminogène est localisé sur le chromosome 6 en position 6q26.

Les activateurs du plasminogène (tPA, urokinase) sont relargués lors des dommages tissulaires et atteignent les molécules de plasminogène dans le caillot par adsorption et diffusion. Ils clivent alors le plasminogène en plasmine, enzyme capable notamment d'hydrolyser la fibrine. Une faible partie du plasminogène peut être activé directement par les facteurs IIa, XIa, XIIa ou par la kallicréine [170].

2. Plasmine

La plasmine est une sérine protéase de poids moléculaire 85 kDa qui provient de l'activation du plasminogène. Elle est constituée de 2 chaînes : une chaîne lourde portant les LBS et une chaîne légère portant le site actif.

La plasmine permet la dégradation de la fibrine en PDF (Produits de Dégradation de la Fibrine). Elle est aussi à la base de la dégradation du fibrinogène mais également des facteurs V, VIII, XIIIa, du vWF, de certains éléments du complément et de la matrice cellulaire [170].

3. Produits de dégradation de la fibrine

Les produits de dégradation de la fibrine sont produits par l'action de la plasmine sur la fibrine. La plasmine clive tout d'abord la fibrine en un fragment appelé PDF X, qui subit à son tour une protéolyse asymétrique avec production de PDF Y et PDF D. Le PDF Y est ensuite clivé à nouveau en PDF D et PDF E. Les PDF X et Y sont appelés précoces et les PDF D et E tardifs.

Les fragments X, Y et D peuvent se complexer avec les monomères de fibrine et empêcher leur polymérisation par formation de complexes solubles. Les divers peptides formés ont également des actions antithrombine et inhibitrice de l'agrégation plaquettaire [170].

4. Activateurs du plasminogène

a. Tissue Plasminogen Activator (tPA)

Le tPA est une sérine protéase de 70 kDa synthétisée principalement par la cellule endothéliale mais également par les cellules mésothéliales, les monocytes ou les macrophages. Chez l'Homme, sa concentration plasmatique est d'environ 70 pmol/L et sa demi-vie est comprise entre 3 et 6 secondes mais il est lié à 80 % à PAI-1 (Inhibiteur de l'activateur de la plasmine 1). Chez l'Homme le chromosome 8 porte le gène codant pour le tPA en position 8p12.

Le tPA est d'autant plus actif qu'il est lié à la fibrine. Il clive alors le plasminogène en plasmine [170].

b. Urokinase

L'urokinase est une protéase trypsine-like de 54 kDa synthétisée par les cellules tubulaires du rein et qui possède une capacité puissante d'activation du plasminogène. Le gène codant pour l'urokinase est porté par le chromosome 10 en position 10q24 chez l'Homme.

La streptokinase est une molécule sécrétée par les streptocoques β -hémolytiques qui possèdent aussi une action fibrinolytique proche de celle de l'urokinase. Malheureusement la présence d'anticorps anti-streptokinase limite son utilisation en pratique [170].

c. Autres

Le facteur XIIIa, la kallikréine et la bradykinine sont également des activateurs du plasminogène. Ils interviennent en particulier sur l'activation de tPA et la pro-urokinase [170].

5. Inhibiteurs du plasminogène

a. Thrombin Activable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI)

Le TAFI est un zymogène de 50 kDa sécrété par le foie aussi appelé carboxypeptidase U. L'origine de son action est sa capacité à cliver la partie C-terminale de la fibrine ce qui rend alors impossible la liaison avec la plasminogène et donc le TAFI a un rôle anti-fibrinolytique. Le gène codant pour TAFI est porté par le chromosome 13 en position 13q14.11 chez l'Homme.

Il est activé par un taux élevé de thrombine et son activation est augmentée par la thrombomoduline. La protéine Ca est, par contre, à l'origine d'une diminution de l'activité du TAFI [170].

b. Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1)

Le *Plasminogen Activator Inhibitor 1* (PAI-1) est une enzyme inhibitrice du tPA et de l'urokinase sécrétée notamment par l'endothélium. L'inhibition des activateurs du plasminogène empêche alors la mise en place d'une fibrinolyse normale [170].

Le gène codant pour cette molécule est localisé sur le chromosome 7 en position 7q21.3-q22 chez l'Homme [170].

c. Autres

La lipoprotéine a, le HGRP (*Histidine Rich GlycoProtein*) et la thrombospondine sont des molécules qui diminuent la capacité du plasminogène à se fixer à la fibrine par compétition vis-à-vis de la lysine.

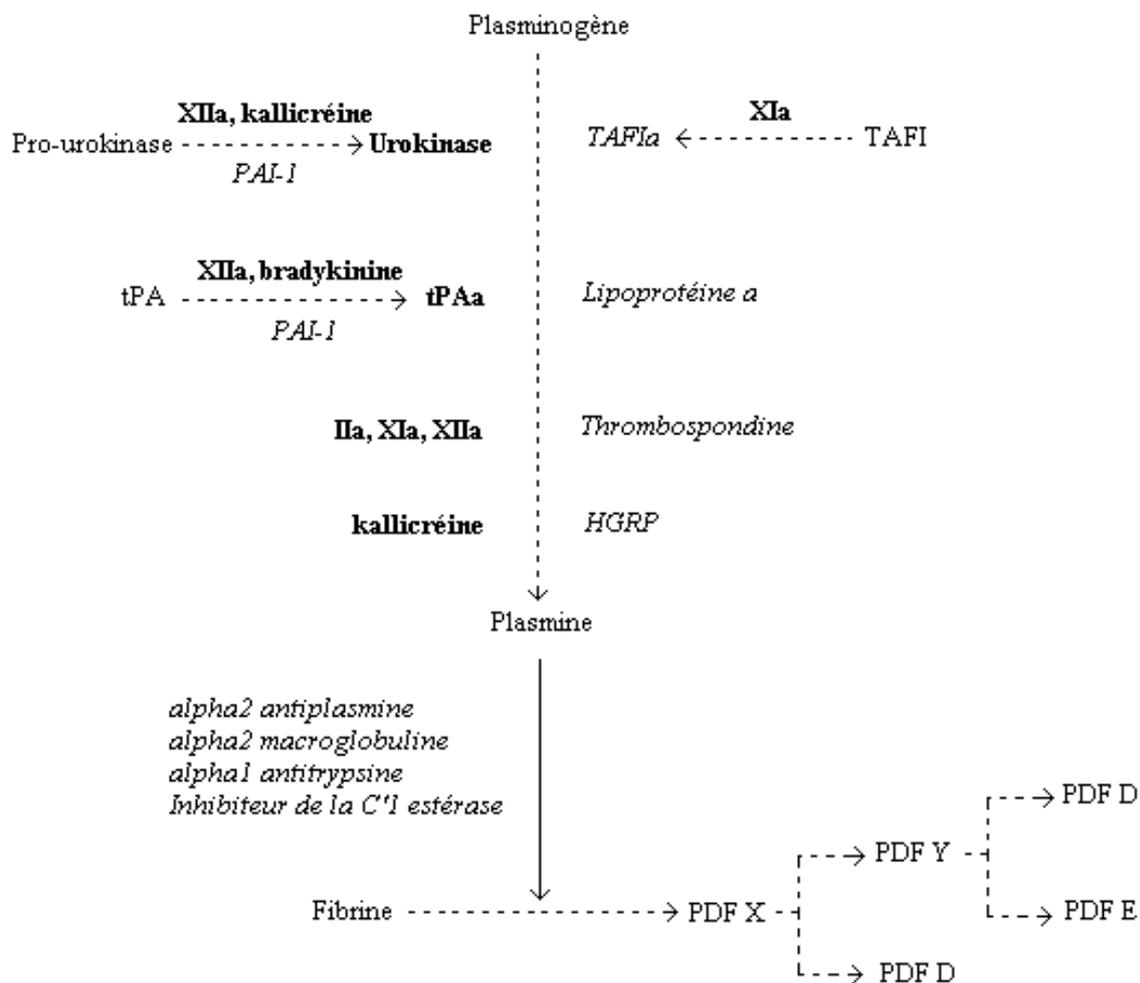
6. Inhibiteurs de la plasmine

L' α 1-antitrypsine, l' α 2-macroglobuline, l' α 2-antiplasmine et l'inhibiteur de la C'1 estérase sont les principaux inhibiteurs de la plasmine.

B. LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE LA FIBRINOLYSE

Pour que la fibrine se dégrade en peptides cela nécessite l'intervention de la plasmine. Cette plasmine est à l'état de plasminogène dans la circulation sanguine. La présence des facteurs IIa, XIa, XIIa, de la kallibréine et de la bradykinine sont à l'origine de l'activation de deux enzymes : la tPa et l'urokinase qui sont des activateurs du plasminogène. Il existe en parallèle des mécanismes inhibiteurs de ces phénomènes notamment par le PAI-1 et le TAFI. Une fois la plasmine formée, celle-ci va cliver les molécules de fibrine en de nombreux peptides, les PDF. Certaines molécules comme l' α 2-antiplasmine sont des inhibiteurs de la dégradation de la fibrine et interviennent pour limiter la fibrinolyse (Figure 12) [194].

Figure 12. Les étapes de la fibrinolyse



Légende :

- - - - - > Indique l'activation d'un facteur.
- ———▶ Indique un effet agoniste d'un facteur sur l'autre ou un effet agoniste sur l'activation d'un facteur.
- Les autres facteurs intervenant dans la voie sont indiqués à côté des flèches pleines ; en gras les agonistes et en italique les antagonistes.
- VII, VIII, X, XI, XII = facteur VII, VIII, X, XI, XII (a = activé).
- TAFI = Inhibiteur de la Fibrinolyse Activé par la Thrombine.
- HWK-kininogène = kininogène de haut poids moléculaire.

HGRP = Histidine-Rich GlycoProtein / PAI = Plasmin Activator Inhibitor / tPA = tissu Plasminogen Activator / TAFI = Thrombin-Activable Fibrinolysis Inhibitor / PDF = Produit de Dégradation de la Fibrine

Après l'étude de la physiologie de l'hémostase, la prochaine partie s'intéresse aux diverses méthodes d'exploration de l'hémostase, des plus usuelles aux dernières méthodes employées en recherche.

DEUXIEME PARTIE :

EXPLORATION DE L'HEMOSTASE

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.

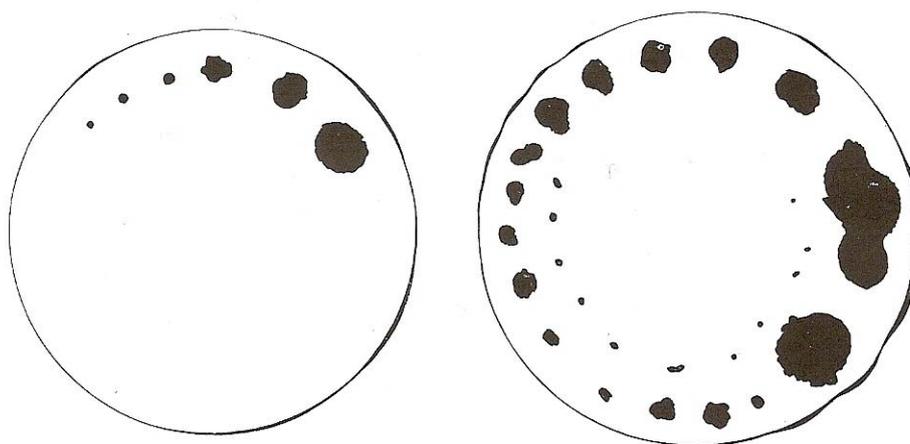
1. Temps de saignement

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.

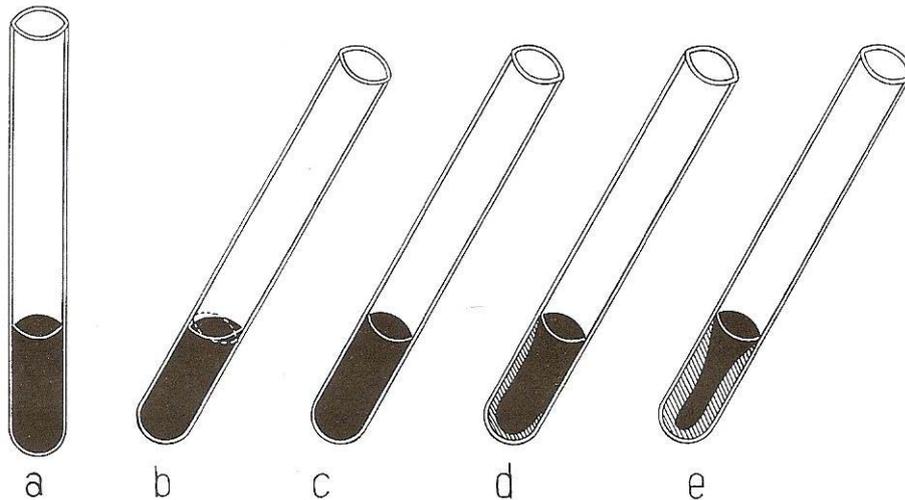
Elle est anormale lors de :

- 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.

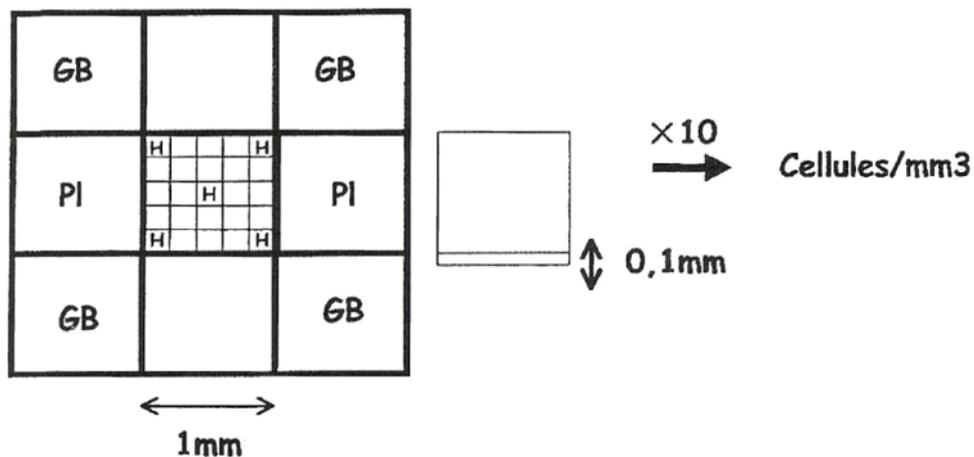
Toutefois un contrôle manuel est à réaliser en complément des valeurs obtenues. En effet, l'EDTA entraîne parfois l'agglutination des plaquettes avec formation d'agrégats plaquettaires comptés par l'automate comme une seule entité d'où une sous-estimation parfois très importante du nombre de thrombocytes.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

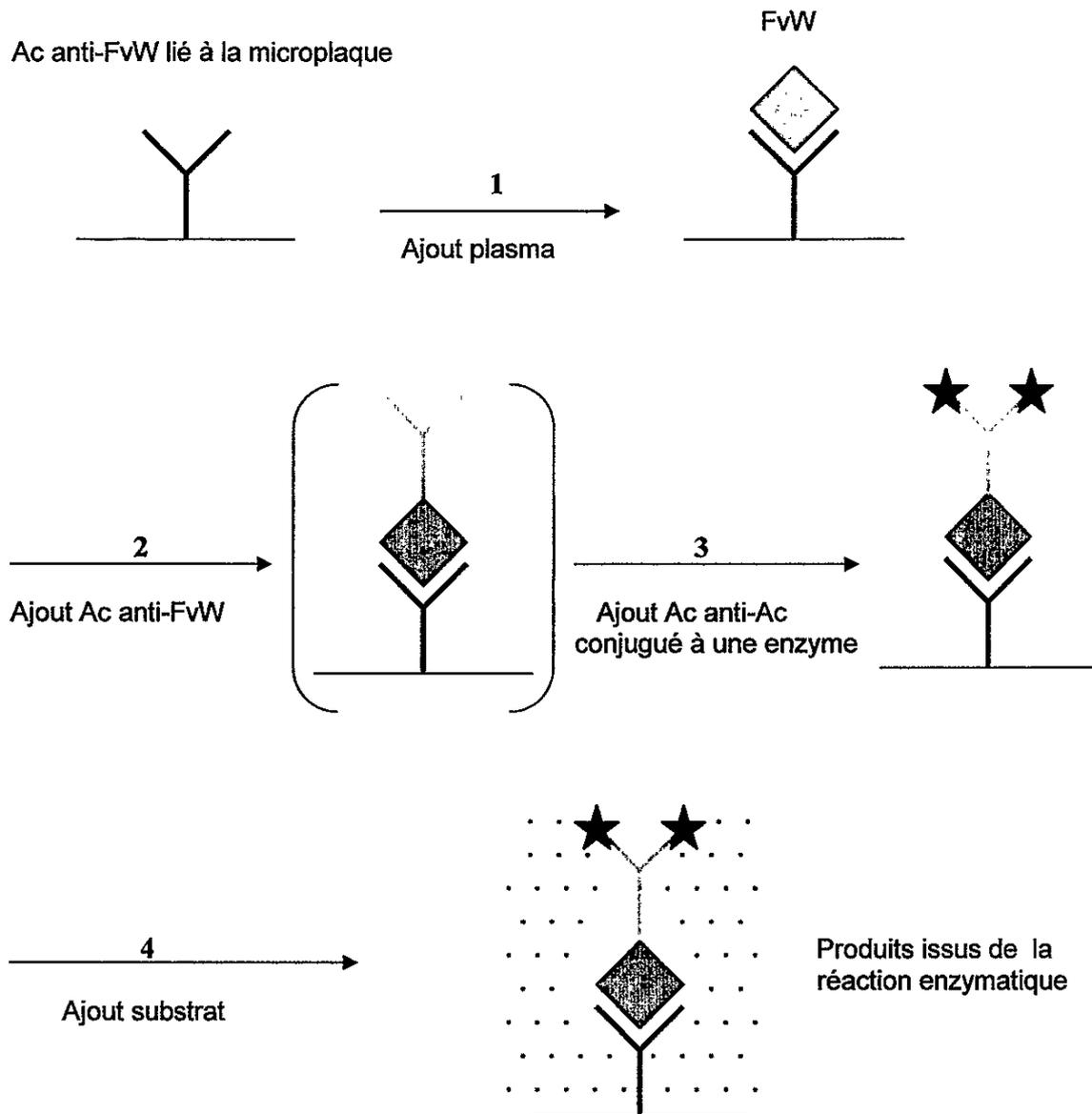
- la sensibilité est supérieure à l'immunoélectrophorèse,
- les résultats sont corrélés avec l'immunoélectrophorèse sauf pour les valeurs extrêmes où les valeurs basses sont majorées et les valeurs hautes minorées,
- les réactifs sont facilement disponibles et bon marché,
- la reproductibilité est correcte,
- 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 hexasulfate) 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

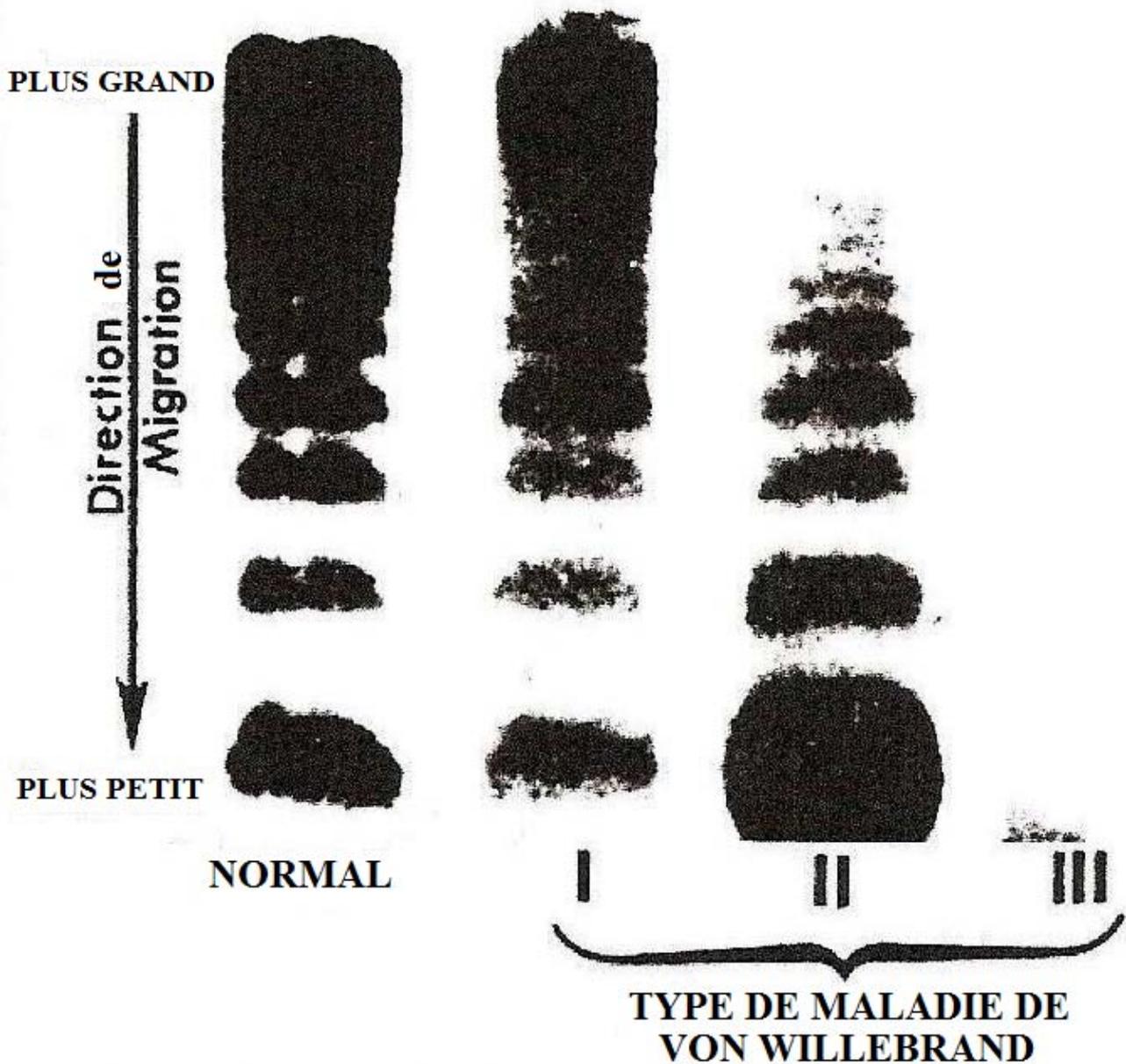
La distribution des multimères est utilisée pour différencier les différents types de maladie de von Willebrand notamment pour le type 2. L'étude de la répartition des multimères plasmatiques est une technique qui fait appel à l'immunoélectrophorèse croisée ou à une analyse multimérique [112]. Ces deux 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 anticoagulant 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.

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.

TROISIEME PARTIE :

**LES TROUBLES HEREDITAIRES DE
L'HEMOSTASE PRIMAIRE**

Les troubles héréditaires de l'hémostase primaire concernent les thrombopathies héréditaires ainsi que les différents types de maladie de von Willebrand.

Lorsqu'un test génétique existe, pour chaque maladie concernée, il sera indiqué dans le tableau récapitulatif présenté en annexe 2.

I. THROMBOPATHIES CONSTITUTIONNELLES

A. ANOMALIES DES GLYCOPROTÉINES MEMBRANAIRES

1. Thrombasthénie de Glanzmann

La thrombasthénie de Glanzmann est un défaut héréditaire qualitatif ou quantitatif du complexe glycoprotéique GPIIb/GPIIIa plaquettaire. Le premier cas a été décrit en 1918 par un pédiatre suisse, Edward Glanzmann, chez l'Homme, mais la compréhension du mécanisme de cette maladie n'a été découverte qu'au milieu des années 1970. Des mutations génétiques responsables de la maladie ont été découvertes chez l'Homme en 1990. C'est une maladie rare puisque jusqu'en 2001, seuls 200 cas avaient été décrits dans la littérature [9, 172].

En médecine vétérinaire, le premier cas rapporté l'a été par Dodds en 1967 chez l'Otterhound [15]. Depuis des cas ont été décrits chez le Montagne des Pyrénées et chez le Basset Hound [15]. Néanmoins les études moléculaires chez le Basset Hound n'ont pas confirmé l'existence de la thrombasthénie de Glanzmann ; par conséquent la thrombopathie du Basset Hound sera étudiée ultérieurement.

a. Classification de la thrombasthénie de Glanzmann [81, 172]

La première classification établie par Caen était basée sur le contenu en fibrinogène des granules α plaquettaires et sur le degré de rétraction du clou plaquettaire. La classification actuelle prend également en compte la quantité de complexe GPIIb/IIIa.

a. Thrombasthénie de Glanzmann de type I

Elle représente la grande majorité des cas chez l'Homme et est caractérisée par une déficience majeure en complexe GPIIb/IIIa (< 5 % de la concentration normale), une incapacité des thrombocytes activés à se lier au fibrinogène, une faible concentration en fibrinogène des granules α et une incapacité des plaquettes à s'agréger et à permettre la rétraction du clou plaquettaire.

Les thrombasthénies de Glanzmann décrites chez l'Otterhound et le Montagne des Pyrénées correspondent au type I décrit en médecine humaine. Néanmoins chez l'Otterhound, la maladie semblait associée à un syndrome de Bernard-Soulier puisque de 30 à 80 % des plaquettes avaient une taille géante et une forme atypique lors de l'étude de Raymond et Dodds en 1979. C'est pourquoi on parlait alors de thrombopathie thrombasthénique. Entre temps la maladie a été presque éradiquée chez l'Otterhound. Mais à la fin des années 1980, les descendants des premiers chiens malades présentaient un dysfonctionnement plaquettaire identique à celui présent dans la thrombasthénie de Glanzmann de l'Homme mais sans thrombocytes anormaux [15].

β . Thrombasthénie de Glanzmann de type II

Elle représente 14 % des cas décrits chez l'Homme. Les plaquettes des patients atteints possèdent entre 10 et 20 % de complexe GPIIb/IIIa normaux, se lient faiblement entre elles et au fibrinogène et la rétraction du clou plaquettaire est anormale. Le type II n'est pas décrit, à l'heure actuelle, ni chez le Chien ni chez le Chat [15, 100].

γ . Thrombasthénie de Glanzmann variant

Elle ne concerne que 8 % des cas décrits en médecine humaine. Les thrombocytes des individus atteints ont de 50 à 100 % de la concentration normale en complexe GPIIb/IIIa mais ne se lient ni entre eux ni au fibrinogène. Contrairement aux types I et II, la maladie de Glanzmann est ici due à un défaut qualitatif des complexes GPIIb/IIIa. Le type variant n'est pas décrit, à l'heure actuelle, ni chez le Chien ni chez le Chat [15, 100].

b. Symptômes [81, 172].

α. Chez l'Homme

La thrombasthénie de Glanzmann est caractérisée par des saignements excessifs consécutifs au défaut de formation du clou plaquettaire. Ainsi chez l'Homme elle se traduit majoritairement par des épistaxis sévères mais également par des saignements gastro-intestinaux, des hématomes, des hémorragies gingivales, des hématuries, des métrorragies ou encore des hémarthroses ; ces symptômes apparaissent avant l'âge de 5 ans et diminuent avec l'âge. Les hémorragies spontanées sont rares et elles sont généralement consécutives à un traumatisme, à une chirurgie ou encore à la chute des dents de lait. Chez la femme atteinte, la période de menstruation et l'accouchement sont des périodes à risque majeur.

La sévérité des saignements est impossible à prévoir. Toutefois il arrive que les patients présentent des anémies secondaires au manque de fer suite à de nombreuses hémorragies.

β. Chez le chien [15, 16]

Les chiens atteints présentent des saignements provenant des muqueuses et un allongement du temps de saignement lors de traumatismes ou de chirurgie. Ainsi les signes cliniques sont identiques à ceux retrouvés chez l'Homme.

c. Diagnostic [15]

L'augmentation du temps de saignement amène le clinicien à explorer l'hémostase. Les tests de l'hémostase primaire montrent une numération plaquettaire normale associée à un défaut d'agrégation plaquettaire et de rétraction du clou plaquettaire. L'exploration de la coagulation sanguine ne met en évidence aucun trouble (Temps de Quick et temps de céphaline activée normaux). La mesure de la quantité de facteur de von Willebrand donne des résultats dans les normes. Les résultats obtenus conduisent à suspecter un trouble de la fonction plaquettaire (Tableau 2). Boudreaux et Catalfamo ont étudié la thrombasthénie de Glanzmann chez l'Otterhound [9].

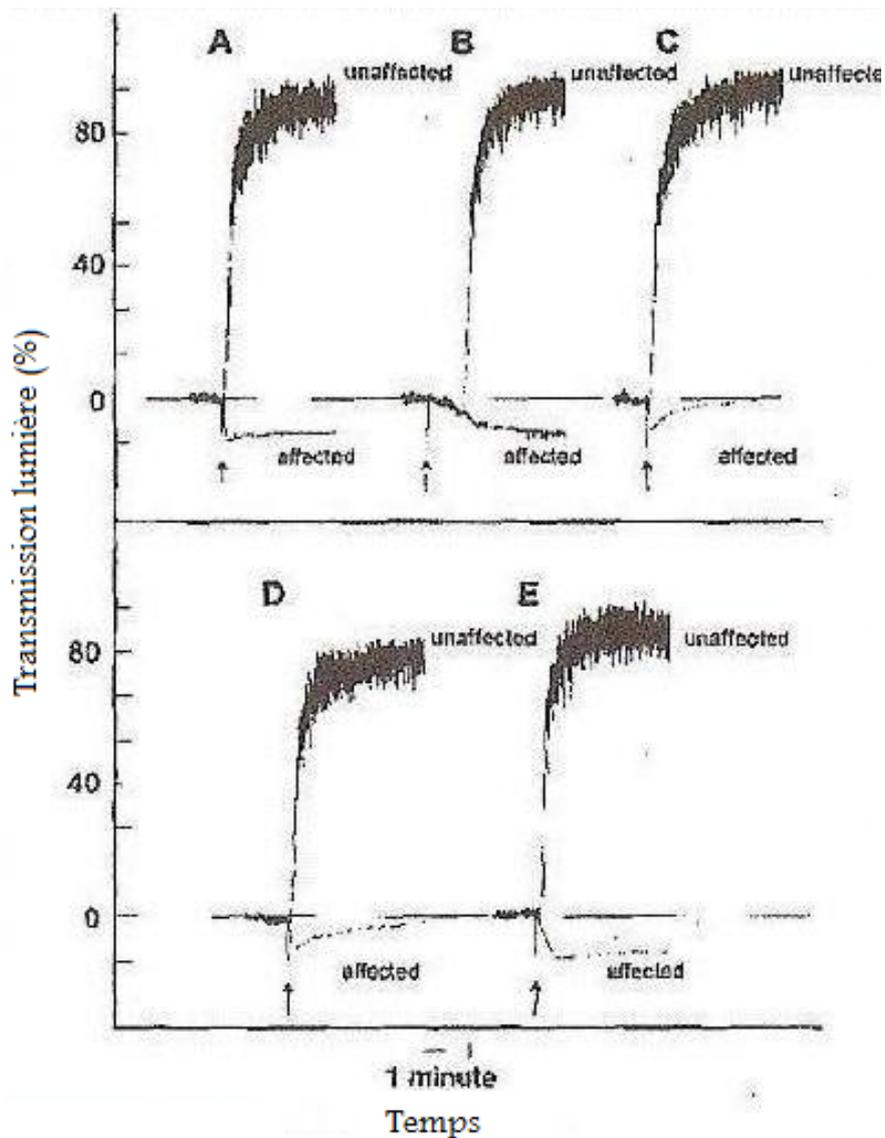
Tableau 2. Comparaison des résultats aux examens complémentaires entre la maladie de von Willebrand et les différents types de thrombasthénie de Glanzmann d'après [16]

	Maladie de von Willebrand (chien)	Thrombasténie de Glanzmann type I	Trombasthénie de Glanzmann type II et variant
Numération plaquettaire	Normale	Normale	Normale
Morphologie plaquettaire	Normale	Normale	Normale
Agrégation plaquettaire	Normale	Absente/Diminuée	Absente/Diminuée
Release plaquettaire	Normale	Normale	Normale
Adhésion plaquettaire	Absente/Diminuée	Normale	Normale
Rétraction du clou	Normale	Absente/Diminuée	Absente/Diminuée
Fibrinogène plaquettaire	Normale	Diminuée	Normale
vWF	Absente/Diminuée	Normale	Normale
GPIIa/IIIb	Normale	Absente/Diminuée	Normale/Diminuée
GPIb/V/IX	Normale	Normale	Normale
Récepteur à la vitronectine	Normale	Absente/Augmentée	Normale
Mutation GPIIb ou GPIIIa	Non	Chien : GPIIb Homme : GPIIb et GPIIIa	Homme : GPIIb et GPIIIa

L'agrégation plaquettaire mesurée par turbidimétrie, suite à la stimulation par l'ADP, la thrombine, le collagène ou le PAF, a montré une absence quasi-totale de celle-ci, contrairement à l'agrégation plaquettaire de chiens normaux (Figure 18) [9].

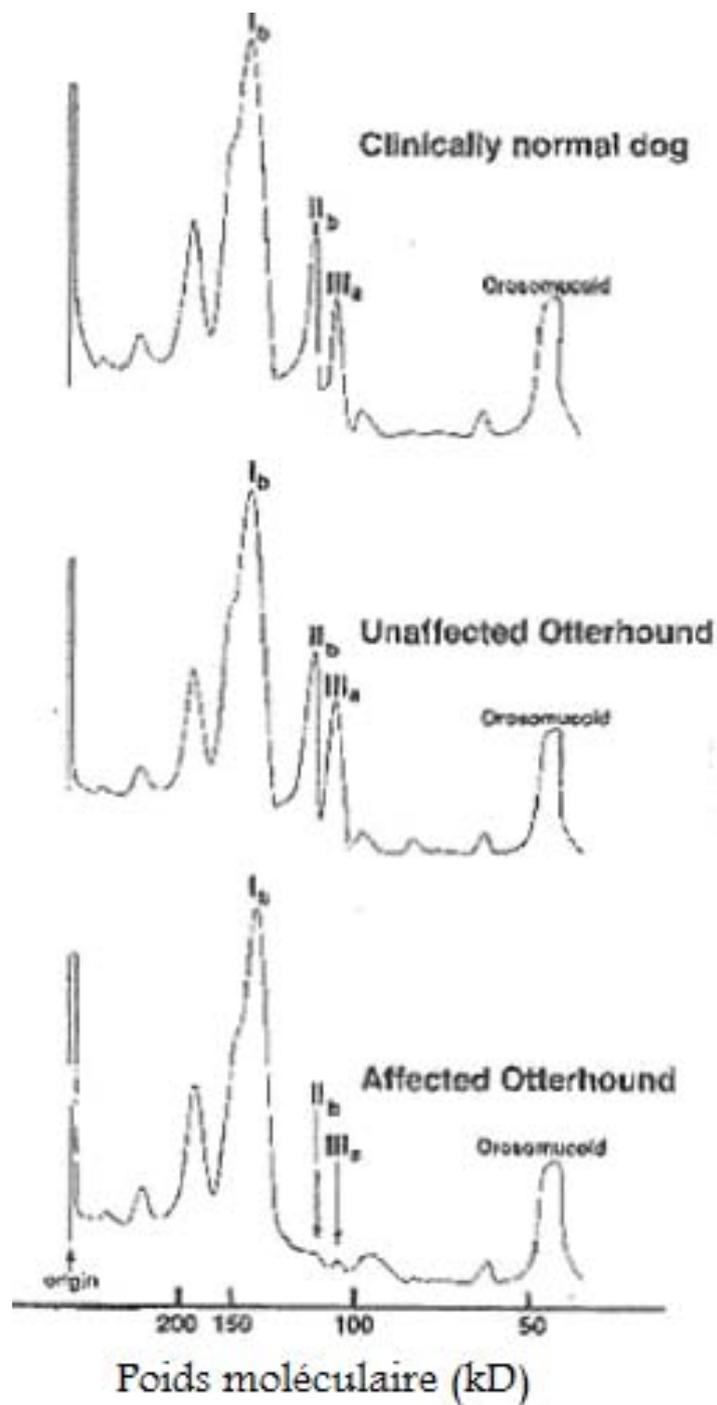
Les auteurs ont également mesuré la distribution des glycoprotéines membranaires chez des chiens sains et atteints de thrombasthénie (de race Otterhound) (Figure 19).

Figure 18. Agrégation plaquettaire en réponse à différents facteurs chez le Chien d'après [9]



Légende : la figure 18 montre qu'en réponse à l'ADP (A), au collagène (B), à la thrombine (C), au PAF (D) et aux ionophores de calcium (E), un Otterhound thrombasthénique (« affected ») ne présente aucune agrégation plaquettaire contrairement à ce qui se passe chez un chien sain (« unaffected »). L'agrégation plaquettaire est mesurée par une augmentation de la transmission de lumière.

Figure 19. Distribution des glycoprotéines membranaires chez le Chien d'après [9]



Légende : la figure présente la distribution des glycoprotéines membranaires chez un chien sain (« *clinically normal dog* »), un Otterhound sain (« *unaffected Otterhound* ») et chez un Otterhound atteint (« *affected Otterhound* »).

Ils ont observé une quasi-absence des glycoprotéines IIb et IIIa (Figure 19) et une augmentation de la quantité de glycoprotéine Ib chez l’Otterhound atteint de thrombasthénie.

Afin de déterminer si le trouble était intrinsèque ou extrinsèque aux plaquettes, Dodds et collaborateurs ont lavé des plaquettes de chiens atteints et chiens normaux puis les ont réincorporés dans les plasmas issus de ces mêmes animaux [16]. Les plaquettes des animaux atteints ne présentaient aucune agrégation dans les deux plasmas ce qui mettait en évidence un défaut intrinsèque des plaquettes.

Chez l'Homme, l'étude des glycoprotéines membranaires par cytométrie de flux ou immunoblot a révélé dans le cas des types I et II des variations de la distribution des glycoprotéines membranaires avec une diminution de la quantité de glycoprotéines II et III et une augmentation de la quantité de glycoprotéines I [81].

d. Support génétique de la maladie

a. *Chez l'Homme*

Les hommes comme les femmes sont touchés en nombre égal par la thrombasthénie de Glanzmann, ce qui suggère un mode de transmission autosomique. Les parents des individus atteints sont dans la plupart des cas asymptomatiques et 25 % des personnes atteintes sont issues d'un croisement consanguin ce qui caractérise un mode de transmission récessif. La maladie est présente au Japon, en Afrique, en Amérique, en France, en Iran ... Bien que son incidence soit faible sur la population globale, son incidence dans les populations consanguines est équivalente à celle de la maladie de von Willebrand ou de l'hémophilie A [81, 195].

Plus de 100 mutations différentes dans les gènes codant pour les glycoprotéines GPIIb et GPIIIa ont été référencées à ce jour [195].

Chez l'Homme, les gènes *ITGA2B* (Integrin $\alpha 2\beta$) codant pour la glycoprotéine GPIIb, et *ITGB3* (Integrin $\beta 3$) codant pour la glycoprotéine GPIIIa sont localisés sur le chromosome 17 en position 17q21.32. Le gène *ITGA2B* est composé de 30 exons et couvre 17.2 kilobases. Quant au gène *ITGB3*, il est composé de 15 exons et couvre 65 kilobases [172].

La variété des mutations touchant les deux gènes est très importante : ont été décrites des délétions, des insertions, des mutations faux-sens, non-sens conduisant à la synthèse de protéines tronquées et/ou anormales. Ont été également décrites des anomalies d'épissage. Les grandes délétions sont plus rares [172].

Toutes ces mutations conduisent soit à une absence de formation du complexe IIb/IIIa (qui se produit dans le réticulum endoplasmique) soit, beaucoup plus rarement, à une abolition de la fonction intégrine du complexe IIb/IIIa pourtant normalement formé. Dans cette dernière situation, c'est fréquemment le gène *ITGB3* qui est muté. En 2001, le mécanisme moléculaire à l'origine de ce phénomène a été identifié. Il s'agissait de la destruction d'un pont disulfure dans la région EGF de la protéine GPIIIa conduisant à la création d'une protéine à activité intégrine constitutive, capable de lier le fibrinogène. L'agrégation plaquettaire n'étant plus possible du fait de l'absence de récepteurs libres permettant l'ancrage des plaquettes les unes sur les autres [190].

β. Chez l'Otterhound

Le séquençage des gènes codant pour les sous-unités GPIIb et GPIIIa est récent chez le Chien. La comparaison des séquences humaines et canines a montré une conservation poussée de certaines régions codant pour des domaines fonctionnelles des protéines. La mutation responsable de la thrombasthénie de l'Otterhound a été identifiée en 1999 dans le gène codant pour la sous-unité GPIIb [15]. Il s'agit d'une substitution d'une base guanine par une base cytosine dans l'exon 12, entraînant le remplacement d'une histidine par un acide aspartique au niveau de troisième domaine de liaison au calcium. Le porteur sain est hétérozygote pour l'allèle muté (Figure 20). Ce changement est responsable d'une déstabilisation du complexe IIb/IIIa conduisant au défaut d'expression du complexe à la surface des plaquettes [15].

Figure 20. Séquence du gène codant pour le troisième domaine de la liaison au calcium de la glycoprotéine plaquettaire GPIIb [9]

	D	L	³⁶⁷ D/H	R	D	G	Y	N	D	³⁷⁴ I/V	A	V
Human	GAC	CTC	GAC	CGG	GAT	GGC	TAC	AAT	GAC	ATT	GCA	GTG
Dog	GAC	CTC	GAC	CGG	GAC	GGC	TAC	AAC	GAT	GTT	GCA	GTG
OH	GAC	CTC	GAC	CGG	GAC	GGC	TAC	AAC	GAT	GTT	GCA	GTG
OHC	GAC	CTC	^G _C AC	CGG	GAC	GGC	TAC	AAC	GAT	GTT	GCA	GTG
Affected	GAC	CTC	CAC	CGG	GAC	GGC	TAC	AAC	GAT	GTT	GCA	GTG

Légende : cette figure présente une comparaison de la séquence du gène codant pour le troisième domaine de la liaison au calcium de la glycoprotéine GPIIb entre l'Homme (« *Human* »), un chien cliniquement sain (« *Dog* »), un Otterhound cliniquement sain (« *OH* »), un Otterhound porteur du gène muté (« *OHC* ») et deux Otterhounds atteints (« *Affected* »)

γ. Chez le Montagne des Pyrénées

En 2000, Boudreaux et collaborateurs ont montré que la thrombasthénie de Glanzmann observée chez un Montagne des Pyrénées était dû à deux mutations sur le gène. L'épissage de l'intron 13 n'était en effet pas effectué si l'on observait l'ARNm et une insertion de 14 paires de bases était observée au niveau de l'exon 13 du gène codant pour la glycoprotéine GPIIb (Figure 21) [135].

Figure 21. Comparaison des séquences de l'exon 13 du gène codant pour la glycoprotéine GPIIb [135]

Le défaut de transcription consécutif à l'insertion des 14 paires de bases serait responsable d'un changement de conformation du préARNm qui rendrait le site d'épissage de l'intron 13 inaccessible [135].

A l'heure actuelle, aucun test génétique n'a été développé pour cette maladie.

e. Traitement

Le traitement mis en place lors d'hémorragies ou avant une chirurgie consiste dans l'idéal à injecter à l'animal du plasma riche en plaquettes (PRP) [17]. La dose recommandée en PRP est de 1 unité / 10 kg. Le PRP est préparé à partir de sang entier de chien normal centrifugé à 1000 g pendant 4 minutes ; il peut s'utiliser immédiatement mais il existe aussi des concentrés de plaquettes congelées. En pratique, le vétérinaire est souvent amené à transfuser du sang total ce qui présente l'avantage de ne pas nécessiter de matériel particulier et compense les pertes sanguines lors d'hémorragies excessives mais il est fortement immunogène et le volume à injecter est plus important. Le développement d'anticorps anti-plaquettes est possible mais d'apparition plus lente car le matériel injecté est en quantité faible.

Chez l'Homme, Poon et collaborateurs ont proposé l'utilisation de facteur VIIa recombiné à une dose d'environ 90 µg/kg toutes les deux heures jusqu'à arrêt des saignements [184]. Le facteur VIIa active la voie intrinsèque et donc la formation de fibrine qui stabilise le clou plaquettaire. Des résultats positifs ont été obtenus chez 23 individus sur 24. Ils préconisent d'utiliser dans le même temps des agents antifibrinolytiques tels que l'acide ε-aminocaproïque (300 à 400 mg/kg/j) ou l'acide tranexamique (75 mg/kg/j). L'apparition d'une thromboembolie a été observée chez l'un des individus traités. Même si avant de généraliser l'utilisation du facteur VIIa chez le Chien, un test à plus grande échelle est à réaliser, ce traitement semble être une bonne alternative à la transfusion de plaquettes chez les sujets développant des réactions immunitaires aux plaquettes [15].

La complication la plus fréquente étant le déficit en fer, des injections de fer parentérales ou orales sont fréquemment requises.

2. Syndrome de Bernard-Soulier

a. Historique et épidémiologie

Le syndrome de Bernard-Soulier ou dystrophie thrombocytaire hémorragipare est une maladie autosomique récessive ou dominante [219] associant une tendance aux saignements, des plaquettes géantes et une thrombocytopénie. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1948 par Jean Bernard et Jean-Pierre Soulier, deux hématologistes français. Leur jeune patient présentait des saignements majeurs avec un temps de saignement prolongé et un faible de nombre de plaquettes dont la taille était plus importante qu'habituellement. D'autres cas ont alors été répertoriés souvent associés à de la consanguinité [141].

La maladie reste extrêmement rare puisque seulement une centaine de cas ont été recensés dans la littérature à ce jour, la plupart dans les populations japonaise, européenne et nord-américaine. La prévalence est estimée à moins de 1 / 1 000 000 mais elle est certainement sous-estimée car sous-diagnostiquée [14, 94, 141].

A ce jour aucun cas n'a été publié chez le Chien ou le Chat. On notera cependant que les premiers cas d'Otterhound atteints de thrombasthénie de Glanzmann, présentaient également un syndrome de Bernard-Soulier, qui n'a pas été retrouvé par la suite [15].

b. Symptômes

Les patients atteints présentent habituellement des manifestations cliniques telles qu'un purpura, des épistaxis, des ménorragies, des saignements gingivaux ou encore des saignements gastro-intestinaux. Lors de traumatismes, les hémorragies se prolongent également de manière importante et sont responsables d'ecchymoses importantes mais cela reste relativement peu fréquent.

Le nombre de plaquettes est très diminué à normal ($< 30\ 000 / \mu\text{L}$ à environ $200\ 000 \mu\text{L}$), mais ces valeurs sont fluctuantes sur l'année chez un même patient.

Les temps de saignements sont quasiment normaux (5 à 10 minutes) à très allongés (> 10 minutes). Ces hémorragies persistantes sont présentes très tôt dans l'enfance mais celles-ci s'aggravent au moment de la puberté et à l'âge adulte. Ces saignements peuvent être révélés à l'occasion d'une chirurgie comme une extraction dentaire, une appendicectomie, une splénectomie ... L'accouchement est aussi une période à risque pour la mère atteinte du syndrome de Bernard-Soulier [133].

c. Etiologie moléculaire

Le syndrome de Bernard Soulier est dû à une déficience ou une dysfonction du complexe GPIb-V-IX dont le rôle est d'intervenir dans l'adhésion plaquettaire au site lésé par l'intermédiaire du vWF. Pour former ce complexe 4 sous unités sont nécessaires : GPIb α , GPIb β , GPV et GPIX respectivement encodés par des gènes situés en position 17p12, 22q11.2, 3q29 et 3q21 sur les chromosomes 17, 22 et 3 chez l'Homme. GPIb α , GPIb β et GPIX sont indispensables pour une biosynthèse normale complexe, GPV n'a aucune incidence sur la fonction du complexe. En 2006, 47 défauts génétiques différents responsables du syndrome de Bernard-Soulier ont été identifiés : 20 mutations de GPIb α , 16 de GPIb β et 11 de GPIX [133].

L'étude des différents cas a montré une transmission autosomique récessive de la maladie. Toutefois un cas de transmission autosomique dominante a été décrit dans certaines familles [219].

d. Diagnostic

Le syndrome de Bernard-Soulier est souvent sous-diagnostiqué et en médecine humaine est souvent pris pour un purpura thrombocytopénique idiopathique pour lequel ni les corticoïdes ni la splénectomie ne permettent alors de guérison.

L'allongement du temps de saignement permet une première orientation vers un trouble de l'hémostase primaire. La réalisation d'un hémogramme et d'un frottis sanguin montre une thrombocytopénie (typiquement entre 20 000 et 100 000 plaquettes / μ L) et des plaquettes de forme arrondie (volume = 11 à 16 μ m³ et diamètre = 4 à 10 μ m). Un comptage manuel des plaquettes est souvent nécessaire car leur modification de taille fait que les appareils de comptage automatique les comptent souvent comme des lymphocytes [133].

Une étude de l'agrégation plaquettaire par un agrégomètre révèle un défaut isolé d'agglutination induite par la ristocétine, non corrigé par une addition de plasma normal, contrairement à ce qui se passe dans la maladie de von Willebrand [133].

Un défaut de consommation de la prothrombine est souvent associé et peut être utile pour le diagnostic. Celui-ci est attribué à un déficit de liaison du facteur IX consécutif à un manque de GPIb.

Une cytométrie de flux utilisant un panel d'anticorps monoclonaux spécifiques (CD42 a-d) confirme le diagnostic de syndrome de Bernard-Soulier. Il existe d'autres tests disponibles dans les unités de recherche pour l'étude des glycoprotéines de membrane tels que la séparation sur gel ou

des techniques d'immunoblotting. Enfin des études génétiques sont aussi possibles dans ces laboratoires [133].

e. Traitement

α. Traitement hygiénique

Il n'existe pas de traitement spécifique de la maladie. Les patients atteints sont amenés à éviter les traumatismes et les traitements antiplaquettaires comme l'acide acétylsalicylique (Aspirine®). Ces patients doivent avoir une hygiène buccodentaire irréprochable pour éviter toute maladie gingivale et limiter les besoins d'intervention dentaire. Les femmes atteintes doivent utiliser des produits contraceptifs dès la puberté pour éviter les ménorrhées. Les saignements fréquents peuvent induire un déficit en fer qui est à corriger rapidement pour éviter toute anémie [141].

β. Traitement médical

Les transfusions multiples de plaquettes peuvent amener à développer des anticorps anti-plaquettes. Les injections de desmopressine ou de facteur VIIa recombinant permettent de réduire le temps de saignement des patients [133].

Chez les patients dont le pronostic est engagé, la transplantation de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques issues du cordon ombilical est à considérer. Dans certains cas la splénectomie a permis une amélioration lors de saignements majeurs mais les risques opératoires importants limitent l'intérêt [133].

B. ANOMALIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL

1. Thrombopathie du Basset Hound

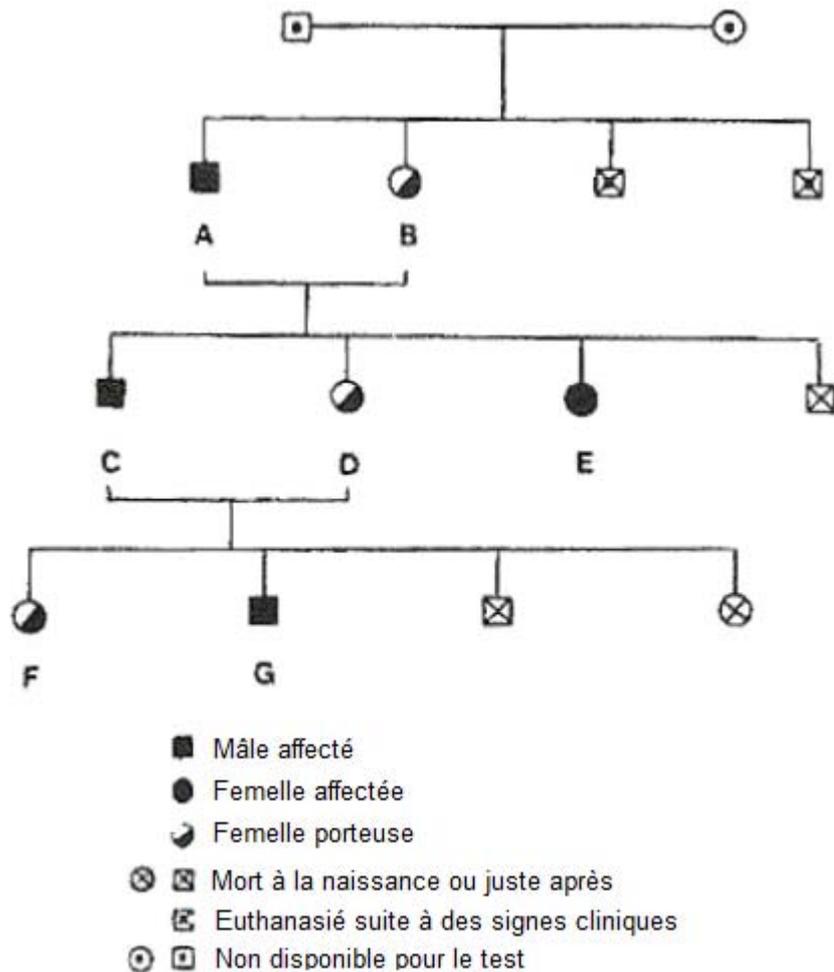
a. Premiers cas décrits

Johnstone et Lotz en 1979 ont décrit pour la première fois une thrombocytopathie héréditaire dans une famille de Basset Hound [115]. En effet plusieurs individus de la lignée, aussi bien mâles que femelles, ont été présentés pour une tendance marquée au saignement et à l'allongement du temps du saignement caractérisés notamment par des anémies, des saignements gingivaux et gastrointestinaux, des paralysies, qui ont conduit à l'euthanasie chez certains chiens. Des chiens asymptomatiques mais porteurs ont également été détectés lors de l'étude des apparentés. Le pedigree obtenu est rapporté sur la figure 22.

Il permet de conclure à une transmission autosomique récessive.

L'étude des voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation n'a révélé aucune anomalie. Le temps de saignement était fortement allongé (supérieur à 15 minutes chez les animaux présentant des signes cliniques). L'examen des plaquettes au microscope n'a montré aucune différence entre les animaux sains et malades, la quantité de thrombocytes est identique dans les deux cas. La rétraction du clou plaquettaire était elle aussi normale. Des tests spécifiques de l'activité plaquettaire (test dérivé du test de Borchgrevink) ont mis en évidence un défaut de consommation plaquettaire lors de blessures vasculaires locales. De plus les interactions des plaquettes avec des billes de verre étaient réduites chez les animaux atteints (3 % contre 27 % chez les chiens sains). Sous l'influence de l'ADP, l'agrégation plaquettaire était réduite chez les homozygotes mais pas chez les hétérozygotes, alors que, sous l'influence du collagène, elle était réduite dans les deux cas de figure. La thrombine, quant à elle, induisait une réponse normale mais retardée.

Figure 22. Pedigree d'une famille de Basset Hound atteinte de thrombopathie d'après [115]



Ces résultats ont montré que l'utilisation du temps de rétraction plaquettaire dans la mise en évidence de troubles plaquettaires était insuffisante pour le diagnostic puisqu'il était normal chez tous les individus.

L'ADP semblait suffisant pour permettre un temps de saignement normal chez les individus porteurs sains et compensait le manque de réaction vis-à-vis du collagène.

b. Caractérisation de la thrombopathie du Basset Hound

Un défaut structurel et/ou fonctionnel des récepteurs membranaires est à l'origine de cette maladie [115].

Boudreaux et collaborateurs, en 1985, ont constaté que la concentration en AMPc des thrombocytes de Bassets touchés était anormalement augmentée (concentration supérieure de 30 à 90 % de la concentration normale). Le calcium était alors séquestré dans le cytoplasme, ce qui entraînait un défaut de sécrétion plaquettaire et d'expression des complexes GPII β /III α à l'origine du défaut d'agrégation. Ainsi a été émise l'hypothèse d'un défaut de transduction du signal d'activation plaquettaire par l'AMPc.

La morphologie plaquettaire au microscope électronique était normale [43]. L'étude des glycoprotéines membranaires ne montrait aucune anomalie. Un défaut de sécrétion des granules denses était toutefois remarqué.

La stimulation plaquettaire par la thrombine et l'ADP était à l'origine d'une augmentation intracellulaire en calcium (relargage de calcium de sites intracellulaires et afflux de calcium extracellulaire). Dans le même temps la thrombine et le collagène entraînaient la formation de 1,2 diacylglycérol qui agissait en coordination avec le calcium comme second messager dans l'activation plaquettaire en augmentant l'affinité de la protéine C kinase pour le calcium. Quant à l'AMPc, il antagonisait la mobilisation de calcium en facilitant le stockage de calcium dans les sites de stockage intracellulaire et il était aussi connu qu'il pouvait inhiber l'hydrolyse des inositols et donc la formation de 1,2 diacylglycérol. En 1986, Boudreaux et collaborateurs ont montré que la concentration plaquettaire élevée en AMPc était consécutive à un défaut d'activité de la phosphodiesterase [14].

2. Thrombopathie du Spitz

Les deux premiers cas décrits dans la littérature concernent deux Spitz femelles âgées respectivement de 3 ans et demi et 13 mois [11].

La première chienne a été présentée en consultation pour un épistaxis bilatéral apparu consécutivement à l'administration d'antibiotiques. Son examen clinique a montré un animal abattu qui présentait des selles noires laissant penser à un méléna. Les premières chaleurs de cette chienne n'ont pourtant pas donné lieu à des saignements excessifs.

Quant à la deuxième chienne, elle a été présentée pour des saignements chroniques depuis l'âge de 6 mois. L'examen clinique a montré la présence de nombreux hématomes sous-cutanés, des

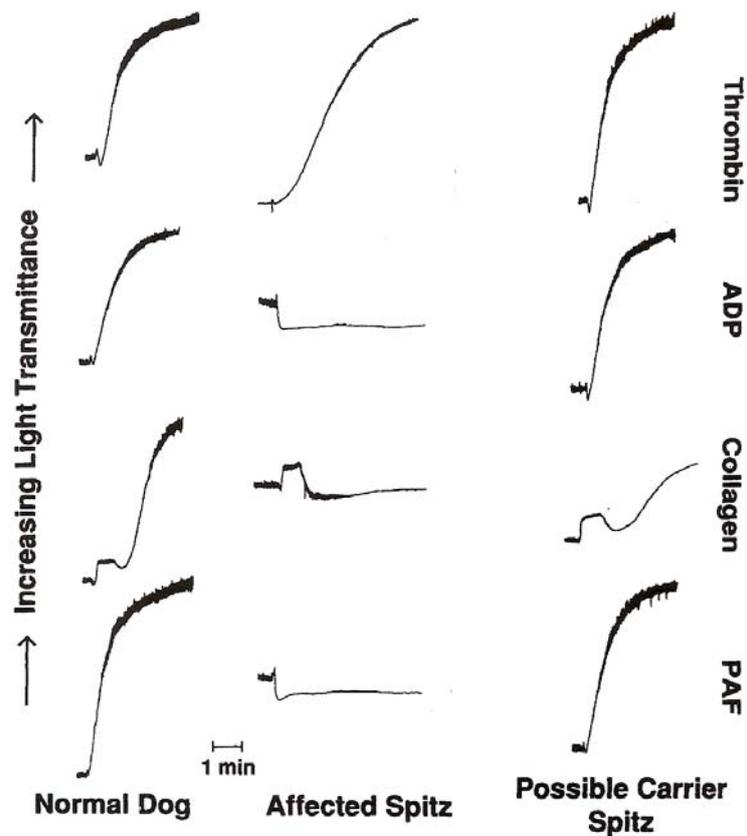
saignements gingivaux et des douleurs aux niveaux des membres après l'exercice. La coupe trop courte d'une griffe a notamment amené un saignement pendant plus de 30 minutes et un épisode d'hématémèse a également été rapporté.

Les examens sanguins réalisés chez ces deux chiennes ont révélé une anémie plus ou moins marquée, un nombre de plaquettes normal et des temps de coagulation normaux. Les valeurs de concentration en antigène de Von Willebrand étaient respectivement de 150 et 49 % par rapport au témoin. Enfin les valeurs des produits de dégradation de la fibrine étaient comprises entre 10 et 40 µg/dL. Aussi des études de l'agrégation, du *release*, de cytométrie de flux et une analyse en microscopie électronique des plaquettes ont été faites.

Les plaquettes des animaux atteints ont montré une absence d'agrégation en présence d'ADP, de PAF ou de collagène ; par contre en présence de thrombine une agrégation était possible même si celle-ci était retardée et lente à se mettre en place (le temps de réponse à la thrombine était chez l'animal témoin d'environ 3 minutes contre 4,5 à 6 minutes chez les Spitz atteints (Figure 23)). L'examen au microscope électronique n'a révélé aucune anomalie des plaquettes des animaux touchés [11].

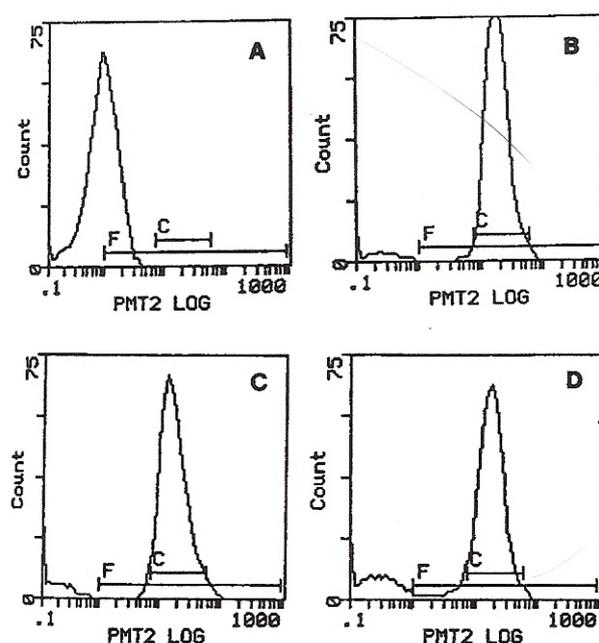
La cytométrie de flux à partir d'anticorps monoclonaux anti-GPIII α humain a indiqué, que contrairement à ce qui se retrouve chez les animaux atteints de thrombasthénie de Glanzmann, le pic de fluorescence de GPIII α était identique à celui des animaux normaux dans le cas des Spitz malades (Figure 24). L'étude du pedigree d'un des deux animaux n'a pas permis de trouver trace d'autres animaux atteints même si chez les deux mâles provenant de la même lignée, l'agrégation suite à l'ajout de collagène était diminué [11].

Figure 23. Représentation de l'agrégation plaquettaire chez le Spitz [11]



Légende : la figure montre la mesure de l'agrégation plaquettaire (par mesure de la transmission lumineuse) en présence de concentrations évaluées à 0.15 μ mole pour la γ -thrombine (« *Thrombin* »), 100 μ mole pour l'ADP, 12 μ g/mL pour le collagène (« *Collagen* ») et 2 μ mole pour le PAF chez un chien normal (« *Normal Dog* »), un Spitz atteint (« *Affected Spitz* ») et chez un Spitz éventuellement porteur (« *Possible Carrier Spitz* »).

Figure 24. Profil d'immunofluorescence de plaquettes chez le Spitz [11]



Légende : les profils intéressent un Otterhound atteint de thrombasthénie de Glanzmann (« A »), d'un chien normal (« B »), d'un Spitz atteint (« C ») et d'un Basset Hound atteint de thrombopathie canine (« D »).

Ainsi la thrombopathie du Spitz ressemble beaucoup à la thrombopathie du Basset Hound. Des cas de thrombopathies du même type ont été décrits dans d'autres races comme le Labrador Retriever, le Boxer ou le Landseer.

3. Etiologie moléculaire de la thrombopathie du Basset Hound, du Spitz et du Landseer [10]

Boudreaux et collaborateurs ont étudiés, en 2006, un type de thrombopathie dans trois races : le Basset Hound, le Spitz et le Landseer. L'analyse génétique a montré que des mutations sur le gène codant pour le CalDAG-GEFI (*Calcium-Diacylglycerol Guanine Nucleotide Exchange Factor 1*) était retrouvée à chaque fois. Trois mutations distinctes ont été détectées, touchant des régions importantes pour la fonction de la protéine et par

conséquent dans l'agrégation plaquettaire. Pour autant aucun test génétique n'a encore vu le jour à l'heure actuelle.

4. Autres thrombopathies décrites

a. Chez le Chien

Callan et collaborateurs, en 2001, ont rapporté deux cas possibles de thrombopathies liées à un défaut de transduction du signal : le premier cas chez un Boxer et le deuxième chez une chienne croisée [39]. L'apparition précoce des symptômes a fait suspecter un trouble héréditaire.

α. Premier cas [39]

Le premier cas concernait un chien Boxer, mâle castré de 2 ans qui présentait des saignements prolongés. La présence d'une hémorragie scrotale et de nombreuses ecchymoses périscrotales a fait suite à la castration à l'âge d'un an. Des saignements rectaux ont également été rapportés peu avant l'opération. Enfin malgré les points de suture cutanés, une plaie cutanée consécutive à une lacération a continué de saigner régulièrement pendant 15 jours.

Les examens complémentaires réalisés dans un premier temps (hémogramme, examen biochimique, temps de coagulation, concentration en facteur de von Willebrand) ont donné des valeurs dans les normes. Par contre le temps de saignement buccal apparaissait supérieur à 7 minutes (norme < 4 minutes) ce qui traduisait probablement un trouble de l'hémostase primaire.

β. Deuxième cas

Le deuxième cas a concerné une chienne croisée de 10 mois souffrant de saignements prolongés : hématochiasis à l'âge de 14 semaines, saignements prolongés à la perte des dents de lait, formation intermittente de pétéchies et d'hématomes. Tout comme dans le cas précédent, des examens identiques ont été réalisés et seul le temps de saignement buccal était prolongé (supérieur à 8 minutes) et n'était pas affecté par une injection de 1 µg/kg de desmopressine.

L'ovariohystérectomie pratiquée à l'âge d'un an entraîna des saignements majeurs durant l'intervention malgré un contrôle strict de la cautérisation et des ligatures. Le lendemain de

l'opération, des hématomes ont été retrouvés au niveau du cathéter intraveineux et sur la zone d'incision.

γ. Etude de ces thrombopathies

L'étude de l'agrégation plaquettaire en réponse à différents agonistes a montré une nette diminution de la réponse des plaquettes des deux chiens étudiés en présence d'ADP et de collagène, et une réponse correspondant à environ la moitié de la réponse normale vis-à-vis de la thrombine (tableau 3). L'agrégation plaquettaire mesurée à l'agrégomètre chez les 2 chiens atteints a montré un déficit net dans les deux cas (Figure 25).

Tableau 3. Agrégation plaquettaire de chiens normaux et de chiens thrombopathiques mesurée à l'agrégomètre d'après [39]

Agoniste	Concentration	Pourcentage d'augmentation de la transmittance		
		Chiens normaux (n = 5)	Cas 1	Cas2
ADP	10 µmol	64 +/- 7	*MP	4
	20 µmol	72 +/- 16	*MP	2
	50 µmol	*ND	13	1
	100 µmol	*ND	5	2
Collagène	20 µg/mL	65 +/- 8	*MP	*ND
	50 µg/mL	91 +/- 10	*MP	8
	100 µg/mL	*ND	5	12
Thrombine	0,5 U/mL	72 +/- 14	*ND	48
	1 U/mL	98 +/- 3	43	67

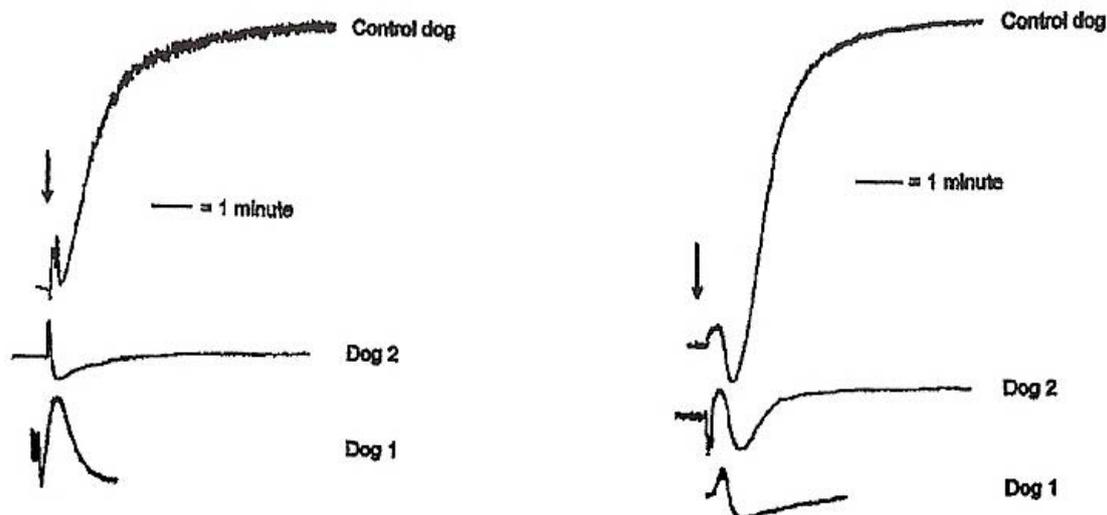
(*ND = non déterminé ; *MP = uniquement modifications de la structure plaquettaire)

Alors que l'existence d'une première vague d'agrégation en présence d'un agoniste laissait à penser à un trouble de la sécrétion plaquettaire, on a constaté que, chez les chiens atteints :

- les concentrations en ADP et en ATP des plaquettes étaient normales,
- le ratio ATP/ADP était dans les valeurs usuelles,
- les quantités de mitochondries, de granules denses, de granules α et de réticulum étaient normales.

Ces résultats excluaient un problème de défaut de sécrétion plaquettaire (*release*) de type maladie du pool vide (anomalie de la sécrétion des granules denses ou granules δ) (voir chapitre C de ce paragraphe).

Figure 25. Agrégation plaquettaire mesurée à l'agrégomètre [39]



Légende : ces graphes concernent l'agrégation plaquettaire, dans deux cas de thrombopathies, de chiens thrombopathiques (« *Dog 1* » et « *Dog 2* ») en comparaison avec un chien témoin (« *Control dog* »).

L'étude de la morphologie thrombocytaire a indiqué que les plaquettes du chien 1 étaient normales alors que les plaquettes du chien 2 étaient plus grandes que la moyenne. La microscopie électronique a révélé la présence de récepteurs GPIIb/IIIa et GPIb chez le chien 1 mais n'a été étudié chez le chien 2 ; toutefois, les résultats obtenus pour l'agrégation plaquettaire excluait toute thrombasthénie de Glanzmann. De la même manière, le chien 2 ne possédait aucun argument en faveur d'autres maladies décrites chez l'Homme telles que l'anomalie de May-Hegglin, le syndrome d'Epstein, ...

Les profils d'agrégation des deux chiens suggéraient un trouble de la transduction du signal responsable d'un défaut de sécrétion semblable à la thrombopathie du Spitz. Néanmoins aucune étude n'a permis de dire si ce trouble touchait l'acide arachidonique, la cyclooxygénase, la synthèse

de thromboxane A2, les récepteurs au thromboxane A2 ou la mobilisation du calcium intracellulaire [39].

b. Chez le Chat. [38]

En 2000, Callan et collaborateurs ont rapporté deux cas de thrombopathies chez deux chats domestique à poils courts sans lien de parenté. L'un de ces chats présentait notamment des anomalies plaquettaires laissant penser à une anomalie de transduction du signal responsable de troubles de la concentration en nucléotides et d'un défaut de relargage (*release*) des granules plaquettaires [38].

Un chat mâle castré domestique à poils courts de 1,5 an a été présenté pour des épistaxis spontanés fréquents contrôlés par des injections intranasales d'épinéphrine. D'autre part, des pétéchies au niveau des oreilles et des saignements gingivaux étaient également présents de manière intermittente. Pour autant lors de la castration aucun saignement particulier n'a été rapporté. Les temps de coagulation, la concentration plasmatique en vWF, la morphologie plaquettaire en microscopie électronique avaient des résultats dans les normes. La numérotation thrombocytaire indiquait une légère thrombocytopenie (100 000 plaquettes / μ L alors que les valeurs normales sont comprises entre 200 000 et 500 000 plaquettes / μ L). L'agrégation plaquettaire en présence d'ADP ou de collagène était fortement diminuée, mais un clou plaquettaire se formait en présence de thrombine. Enfin les concentrations en nucléotides plaquettaires étaient normales.

Ces résultats orientaient donc plutôt vers une anomalie de transduction du signal semblable à celle rencontrée chez l'Homme ou le Chien. L'hérédité de cette maladie n'a pas pu être explorée par absence d'apparentés disponibles.

C. ANOMALIES DES GRANULES DENSES

1. Maladie du pool vide du Cocker américain

a. Symptômes

En 1995, Callan et collaborateurs ont décrit un nouveau type de thrombopathies dans trois familles de Cocker américain [36]. Cette maladie provoque des saignements modérés à sévères suite à des traumatismes mineurs, à des prises de sang ou à une chirurgie. Cinq chiens ont ainsi été étudiés :

➤ Famille 1 :

- Un chien mâle qui présentait depuis l'âge de 8 mois des saignements réguliers et qui est mort d'une hémorragie oro-pharyngée. Dans la même lignée, des cas de tendance au saignement ont été rapportés : un de ses frères de portée est mort à l'âge de 6 mois suite à une hémorragie massive et deux autres chiens dont le cas suivant,
- Une chienne ayant les mêmes parents mais appartenant à une portée ultérieure, et n'ayant pas présenté de signes cliniques.

➤ Famille 2 :

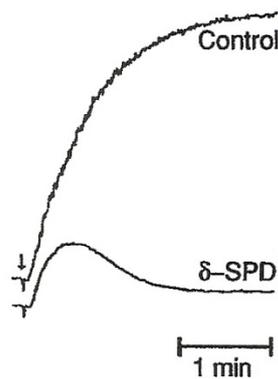
- Un chien mâle de 10 ans qui présentait des saignements chroniques de l'intestin,
- Une chienne, sœur de portée du chien précédent, chez laquelle une anémie régénérative sévère sans signes d'hémolyse ni source de saignement a été rapportée. Suite à un accouplement avec le chien précédent sont nés plusieurs chiots qui sont tous mort d'hémorragies.

➤ Famille 3 :

- Un chien mâle de 12 ans qui présentait des tumeurs prostatiques et vésicales auxquelles étaient associés une hématurie et un hématome intravésical.

Certains chiens étant nés de parent sain, une transmission autosomique récessive a rapidement été suspectée. Les tests sanguins réalisés chez tous ces chiens n'ont pas montré de thrombopénie ; les tests de coagulation et le dosage du facteur de von Willebrand étaient normaux. Cependant le temps de saignement était allongé sur 4 des 5 chiens et l'agrégation plaquettaire en réponse à la présence d'ADP et de collagène était déficiente (Figure 26). Le profil d'un chien présentait un début d'agrégation avant un arrêt, laissant penser à un déficit de sécrétion plaquettaire.

Figure 26. Agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP chez un Cocker [36]



Légende : la courbe du haut (« control ») est la courbe obtenue pour un cocker sain alors que celle du bas (« δ -SPD ») est celle obtenue chez un Cocker atteint de maladie du pool vide.

b. Etiologie

Les plaquettes d'un animal normal contiennent des quantités d'ATP et d'ADP équivalentes à celles retrouvées chez l'Homme. Ainsi dans les thrombocytes humains, les granules denses plaquettaires concentrent 65 % du total en ATP et en ADP ; les 35 % restants se situent dans le cytoplasme. Le ratio ATP/ADP est à peu près constant : il est de 2/3 dans les granules denses et de 9/1 dans le cytoplasme ; le ratio global plaquettaire est par conséquent inférieur à 2,5 chez un chien sain. Hors dans le cas présent le ratio ATP/ADP mesuré dans les plaquettes des chiens atteints était de 8,2 contre 1,9 pour les chiens témoins. Il a également été noté une diminution de l'ADP mais une quantité d'ATP normale. Chez l'Homme, lors de défaut de stockage dans les granules denses encore appelé maladie du pool vide ou « *δ -storage pool defect* » une telle augmentation du ratio est retrouvée [36].

Afin d'évaluer les capacités de stockage des granules plaquettaires, une étude de la capture et de la rétention de sérotonine a été effectuée. En effet la sérotonine n'est pas synthétisée par le thrombocyte mais est captée dans l'environnement avant d'être stockée dans les granules denses [36]. En cas d'anomalie de stockage, la sérotonine n'est pas gardée dans les granules et est alors métabolisée par la monoamine oxydase présente dans le cytoplasme ce qui libère des métabolites dans le milieu. Callan et collaborateurs ont donc laissé des plaquettes de chiens atteints et de chiens sains en présence de sérotonine, marquée par le carbone 14 radioactif, afin d'évaluer les capacités

de captation et de rétention des plaquettes de chiens atteints. Il s'est avéré que ces capacités n'étaient pas altérées chez les chiens atteints.

L'étude au microscope électronique des plaquettes des Cockers touchés ne montrait aucune différence dans le nombre et l'apparence de celles-ci par rapport aux chiens témoins.

Ces résultats suggèraient une anomalie de stockage des granules denses plaquettaires qui contrairement au « *δ-storage pool defect* » de l'Homme ne modifiait pas la quantité et l'apparence des granules denses. La captation et la rétention de la sérotonine étant normales, le déficit en ADP semblait être consécutif à un défaut de transport de l'ADP dans les granules denses. Le mécanisme moléculaire n'a, à ce jour, toujours pas été rapporté dans la littérature.

c. Des gènes candidats pour la maladie du Cocker

Différents gènes ont été découverts comme impliqués dans la sécrétion des granules denses.

L'étude de lignées de souris *Rab27b Knock-Out* (souris transgéniques inactivés pour le gène *Rab27b*) a montré l'apparition de troubles de l'hémostase chez les souris homozygotes *knock-out*.

L'étude de ces troubles a révélé une diminution du nombre et de la sécrétion des granules denses.

La morphologie et la fonction des granules α plaquettaires n'étaient pas altérées. Ces données suggèraient que le gène *Rab27b* jouait un rôle dans la régulation de la sécrétion des granules denses et est un gène candidat pour le « *δ-storage pool defect* » de l'Homme et du Cocker [211].

Chez l'Homme, 15 gènes ont été identifiés comme impliqués dans le syndrome de Hermansky-Pudlak, qui se manifeste, entre autres, par un temps de saignement allongé associé à des anomalies des granules plaquettaires [220]. Enfin, les gènes *Rab38* et *ABCC4* ont été mis en évidence récemment comme, respectivement, effecteurs du développement et du stockage des granules denses [109, 171].

2. Syndrome de Chédiak-Higashi chez le chat Persan

Le syndrome de Chédiak-Higashi est une maladie décrite dans six espèces à savoir l'Homme, la Souris, la Vison, la Vache, l'Orque et le Chat Persan. Il se caractérise, selon l'espèce, par un albinisme oculo-cutané partiel, associé à des granules de mélanine géants, par une sensibilité importante aux infections dues à de nombreux défauts de la fonction leucocytaire et par des symptômes hémorragiques.

a. Description clinique et étiologie

α. Symptômes

Kramer et collaborateurs ont été les premiers à décrire la maladie en 1977 chez trois chats Persans issus d'une famille de 27 chats [127]. Tous les chats atteints avaient une robe couleur « *blue smoke* » de teinte anormalement claire et des yeux de couleur jaune, vert ou vert-jaune clair alors qu'on attendait une coloration cuivrée. L'hypopigmentation oculaire se traduisait par une zone de tapis rouge lorsque celle-ci est éclairée au transilluminateur, alors que chez un chat normal elle était de couleur jaune-vert [158]. Chez certains chats étaient présents une photophobie et un nystagmus spontané mais variable. La majorité des chats atteints présentaient une cataracte bilatérale congénitale qui est apparue avant l'âge de 3 mois. Ce signe clinique n'était présent que dans l'espèce féline et n'a pas été retrouvé systématiquement en cas de syndrome de Chédiak-Higashi humain, ce qui laisse penser que deux gènes distincts pourraient être à l'origine de ces deux formes de la maladie.

Aucune sensibilité particulière aux infections n'a alors été mise en évidence mais une tendance aux saignements a été rapportée, contrairement à l'Homme où ce symptôme est fréquemment retrouvé. Le faible nombre de cas rapportés pourrait expliquer cette particularité du chat.

Aucun saignement spontané n'a été rapporté mais des saignements prolongés étaient présents suite à des interventions chirurgicales mineures ainsi qu'un développement fréquent d'hématomes. Par conséquent les troubles de l'hémostase n'étaient pas un signe d'appel caractéristique de la maladie et ce sont les autres signes cliniques qui pourront alerter le clinicien.

β. Etiologie

Dans les granulocytes neutrophiles du sang périphérique et de la moelle ont été observés des granules éosinophiliques, contenant des enzymes peroxydases. L'examen des poils et de la peau a révélé la présence dans les hampes pileuses de grains de mélanine éparpillés, de grande taille et de forme irrégulière et allongée. L'étude de la lignée a montré alors une transmission autosomique récessive de la maladie chez le Persan [127].

Colgan et collaborateurs ont montré en 1989, en utilisant un agrégomètre, que les plaquettes des chats homozygotes atteints du syndrome de Chédiak-Higashi étaient capables de s'agréger en présence d'ADP ou de collagène, mais aucune sécrétion plaquettaire d'ADP n'a été montrée [52]. Ces résultats suggèrent que l'allongement du temps de saignement était consécutif à une déficience des granules denses. La microscopie électronique a permis de montrer l'absence totale de granules plaquettaires denses chez les chats homozygotes ; ce déficit complet semblait être une caractéristique du syndrome chez l'animal. Chez le Chat, cette absence de granules se traduit par une diminution de la concentration plaquettaire en ADP, ATP, sérotonine et Mg^{2+} dont la libération a un rôle pro-agrégant plaquettaire. On a noté aussi une augmentation du ratio ATP/ADP, caractéristique de la maladie.

Le manque de sérotonine induit un déficit dans la synthèse d'acide arachidonique qui pourrait être à l'origine de la sensibilité des chats aux infections puisque la molécule ne joue plus son rôle chimotactique et activateur des polynucléaires neutrophiles et des macrophages.

Chez la Souris, le syndrome correspond à la couleur beige. Le gène en cause a été identifié et nommé *CHSI* (*Chédiak Higashi Syndrome 1*) ou *LYST* (*Lysosomal Trafficking Regulation*). Des mutations du gène *LYST* ont été identifiées chez l'Homme et sont responsables de la maladie humaine [166, 179].

γ. Diagnostic

La maladie n'a, pour le moment, été décrite que chez le chat Persan. Les chats homozygotes présentent un allongement du temps de saignement buccal (14,1 min ; norme = 1,4 à 2,4 min). Ce temps est aussi significativement allongé chez les chats hétérozygotes (2,6 min en moyenne) mais certaines valeurs de chats homozygotes étant dans les normes, l'utilisation de cette méthode comme dépistage de la maladie est insuffisante.

L'examen microscopique des poils permet de détecter des anomalies des grains de mélanine mais ils sont cependant parfois peu nombreux et difficiles à observer [185].

L'hémogramme montre une neutropénie et le frottis sanguin révèle des anomalies dans les granules intracytoplasmiques des leucocytes.

L'examen de certitude reste l'analyse au microscope électronique ou l'étude à l'aide d'un agrégomètre ou d'une cytométrie de flux mais ces méthodes restent du domaine de la recherche à l'heure actuelle. Le gène n'ayant toujours pas été identifié, aucun test génétique n'est disponible à l'heure actuelle.

δ. Traitement et pronostic

L'évolution de la maladie conduit inévitablement à la mort de l'animal soit suite à une infection soit une hémorragie. L'évolution terminale décrite chez l'Homme (pancytopénie et hépatomégalie) n'est pas décrite à ce jour dans la littérature.

Cowles et collaborateurs, en 1992, ont réussi à diminuer le temps de saignement par la mise en place d'une transfusion de plaquettes chez des chats atteints de syndrome de Chédiak-Higashi [56].

3. Autre anomalie des granules denses décrite [38]

En 2000, Callan et collaborateurs rapportent deux cas de thrombopathies chez deux chats domestique à poils courts [38]. Alors que le premier cas ressemblait plutôt à une anomalie de transduction du signal, le deuxième chat présentait des anomalies plaquettaires laissant penser à une maladie du *pool* de stockage.

En 2000, une chatte de 4 mois est présentée en consultation pour des saignements intermittents gingivaux, le dernier épisode ayant abouti à une anémie majeure, ainsi que pour des hémorragies sévères suite à des lésions au niveau du nez et des oreilles. Les temps de coagulation, la concentration plasmatique en facteur de von Willebrand, la morphologie et le comptage plaquettaire ont des résultats dans les normes. Toutefois le temps de saignement buccal est fortement prolongé (6,5 minutes – norme < 2,5 minutes) et les tests d'agrégation plaquettaire indiquent une réponse défectueuse en présence d'ADP, de thrombine ou de collagène. Les mesures des concentrations en nucléotides plaquettaires étaient :

- ATP : 11,49 $\mu\text{mol}/10^{11}$ plaquettes (chat normal : 8,93 +/- 1,39 $\mu\text{mol}/10^{11}$ plaquettes),
- ADP : 1,97 $\mu\text{mol}/10^{11}$ plaquettes (chat normal : 5,9 +/- 2,7 $\mu\text{mol}/10^{11}$ plaquettes),

- ATP / ADP : 5,82 (chat normal : 1,89 +/- 0,98).

Cette augmentation du ratio ATP / ADP amène à suspecter soit un déficit isolé en granules denses, soit une anomalie de type maladie du « *pool* de stockage » ou maladie du *pool* vide qui n'était décrite chez le Chat qu'en association avec le syndrome de Chédiak-Higashi.

L'apparition dès le jeune âge chez cet animal a permis de supposer une origine génétique de ce trouble mais l'absence d'étude du pedigree du chat atteint n'a pas permis de confirmer ou d'infirmer l'héritabilité de ce trouble [38].

D. HÉMATOPOÏÈSE CYCLIQUE DU COLLEY GRIS

Les colleys à la robe de couleur grise voient la quantité de leurs cellules sanguines fluctuer en fonction du temps selon un rythme cyclique. Cette particularité est attribuée à un défaut de régulation au niveau des cellules souches primitives de la moelle osseuse. Le premier cas a été décrit en 1967 et depuis cet animal est apparu comme un modèle intéressant pour la neutropénie cyclique humaine [144].

Il a été démontré que la maladie était présente dès la naissance du chien [99] et qu'elle se transmettait sur le modèle autosomique récessif [117].

1. Symptômes généraux

Di Giacomo et collaborateurs en 1983 ont étudié les signes cliniques de la maladie en fonction de l'âge chez plusieurs Colleys [61]. Pour noter la gravité des symptômes, ils ont pris en compte la quantité de neutrophiles, la température rectale, la présence de signes cliniques et la mise en place d'un traitement antibiotique. L'étude a permis de montrer que les animaux présentaient des infections pendant un quart à deux tiers de leurs cycles. Les animaux présentaient de la fièvre et environ la moitié a présenté une léthargie marquée (Tableau 4). La durée d'un cycle était d'environ 10 à 14 jours et les crises duraient de 2 à 4 jours.

Tableau 4. Fréquence des signes cliniques observés lors du cycle hématopoïétique
ayant précédé la mort chez 18 Colleys gris [99]

Signes cliniques	Nombre d'animaux	Pourcentage
Fièvre	17	94
Léthargie	8	44
Anorexie	5	28
Maladies digestives	5	28
Maladies respiratoires	5	28
Ictère	5	28
Déshydratation	2	11
Douleur	1	6
Conjonctivite	1	6
Abcès (sous-cutané)	1	6
Méléna	1	6

Les autopsies réalisées ont montré des résultats variables en fonction de l'âge de l'animal. Ainsi les jeunes animaux présentaient plus particulièrement des processus infectieux aigus au niveau des poumons, du tractus digestif ou des reins, alors que les vieux animaux ont plutôt montré des signes d'inflammation chronique dans ces mêmes organes. Sur les chiens âgés de plus de 30 semaines, une amyloïdose était fréquemment retrouvée (Tableau 5).

Les neutropénies cycliques sont généralement associées à une thrombocytose et à une réticulocytose cycliques. Une monocytose marquée intervient peu après. L'étude du myélogramme de chiens atteints a montré une alternance de la prédominance des lignées érythrocytaires et myéloïdes compatibles avec les modifications constatées sur l'hémogramme. Enfin des variations cycliques se retrouvaient au niveau des taux d'érythropoïétine, de facteurs de stimulation et d'activité (GCSF : *Granulocyte Colony Stimulating Factor*). Il semblerait que ces variations soient liées à des variations au niveau des cellules souches pluripotentes puisqu'une greffe de cellules de moelle osseuse rétablit un profil hématopoïétique normal chez un chien atteint [57].

Tableau 5. Distribution des pourcentages de lésions par organes à l'autopsie par organes dans
4 groupes de Colley Gris

Lésions	Groupes*			
	I	II	III	IV
Des poumons :				
Bronchopneumonie aigüe	57	0	0	0
Pneumonie interstitielle aigüe	43	100	25	0
Pneumonie interstitielle chronique	0	0	75	100
Pleurite chronique	0	20	0	0
Calcification	0	0	75	50
Des reins :				
Glomérulonéphrite mésangioproliférative	43	20	75	100
Pyélonéphrite aigüe/chronique	43	0	0	0
Néphrite interstitielle chronique	0	40	100	100
Néphrose	43	80	50	50
Calcification (tubulaire)	43	20	50	0
Amyloïdose	0	0	0	50
Du cœur :				
Endocardite valvulaire chronique	29	40	25	0
Myocardite chronique	0	20	50	0
Nécrose / dégénérescence myocardique	0	20	75	0
Calcification myocardique	0	20	75	0
Du tractus gastro-intestinal :				
Gastrite aigüe	50	0	0	0
Gastrite chronique	0	0	25	0
Entérite aigüe	40	40	0	0
Entérite chronique	20	20	50	100
Pancréatite	25	0	50	100
Calcification (stomacale)	0	0	50	0
Amyloïdose (intestine grêle)	0	0	25	0
Du foie :				
Cholangite	29	0	0	0
Dégénérescence graisseuse	71	40	100	50
Nécrose hépatique	29	0	0	100
Hyperplasie des cellules de Kupffer	0	0	50	100
Amyloïdose	0	0	50	100
De la rate :				
Splénite aigüe / chronique	66	0	0	0
Déplétion lymphoïde	83	100	100	100
Histiocytose	100	100	100	100
Amyloïdose	17	40	100	100
Des nœuds lymphatiques :				
Déplétion lymphoïde	100	100	25	0
Histiocytose	100	100	100	100

* Groupe I = chiens de 10 à 16 semaines / Groupe II = chiens de 17 à 21 semaines / Groupe III = chiens de 30 à 35 semaines / Groupe IV = chiens de plus de 52 semaines

2. Modifications plaquettaires

Comme cité précédemment des cycles de thrombocytose sont présents chez les chiens atteints. Cependant on retrouve également des défauts d'adhésivité et de rétraction du clou plaquettaire, indépendants des neutropénies cycliques, mais corrigés par une greffe de cellules de moelle osseuse. On note aussi un défaut d'agrégation plaquettaire en présence de collagène associé à un défaut de stockage de la sérotonine dans les granules denses.

Lothrop et collaborateurs, en 1991, ont étudié l'agrégation plaquettaire, la capacité de stockage des granules et la capacité de phosphorylation des protéines [142]. L'agrégation plaquettaire de chiens atteints et de chiens normaux a été mesurée en présence de doses croissantes de 8 agonistes : collagène, thrombine, PAF, acide arachidonique et épinéphrine, calcium, ADP, phospholipase C et 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). Un défaut d'agrégation a été noté pour le collagène, le PAF, le TPA et la thrombine mais était normal pour les autres molécules. Le stockage de la sérotonine dans les granules denses est apparu fortement diminué chez les individus homozygotes, mais normal chez les hétérozygotes. De plus, chez les chiens hétérozygotes, l'agrégation était intermédiaire en présence de collagène ou de PAF. Alors que la thrombine stimule la phosphorylation des protéines de 20 kDa et de 40 kDa (cible de la protéine kinase C, le collagène n'entraîne qu'une phosphorylation des protéines de 20 kDa. Ces résultats suggèrent une atteinte de type « δ -storage pool defect » mais le fait que les chiens hétérozygotes pour l'hématopoïèse cyclique aient des quantités normales de sérotonine dans les granules denses et que l'ajout de sérotonine ne modifie pas l'agrégation ne sont pas expliqués par cette maladie. A ce jour, la relation entre ces processus et les cycles hématopoïétiques est encore inconnue.

3. Génétique

L'étude des pedigrees des colleys atteints de la maladie a permis de confirmer une transmission autosomique récessive de l'hématopoïèse cyclique.

Chez l'Homme, la maladie est due à des mutations du gène *ELA2* (*élastase 2*) qui code pour l'élastase des neutrophiles et contrairement au Chien, elle se transmet sur le mode autosomique dominant [105].

En 2003, Benson et collaborateurs ont montré que les Colleys atteints de neutropénie cyclique ne portaient pas de mutation dans le gène *ELA2* mais dans le gène codant pour la sous-unité β du gène *AP3* (*Adaptation Protein Complex 3*). Ce gène est impliqué dans le transport de protéines de l'appareil de Golgi vers les lysosomes [8].

Ainsi des tests génétiques sont aujourd'hui disponibles dans plusieurs laboratoires (Healthgene, Laboklin, Progenus et VetGen) (Annexe 2).

4. Traitement

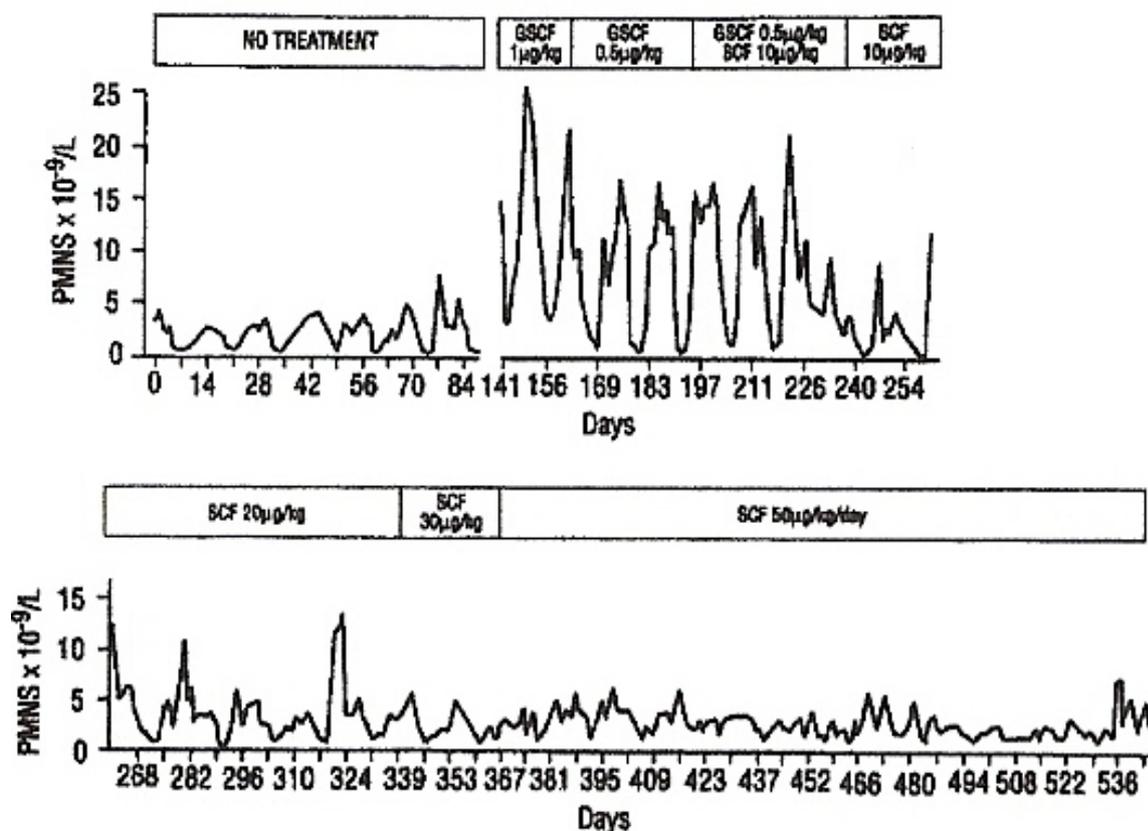
La mise en place d'un traitement antibiotique lors d'épisode de neutropénie est importante car elle permet de limiter toute infection éventuelle dont les conséquences amèneraient à la mort de l'animal. Le traitement à long terme qui paraît le plus efficace reste la greffe de cellules de moelle osseuse qui restaure une activité normale de l'hématopoïèse.

Enfin des traitements à base d'entotoxines ou de lithium sont rapportés comme ayant une efficacité contre cette maladie [57].

Dale et collaborateurs, en 1995, ont examiné l'intérêt du facteur de croissance des cellules souches (*SCF* : *Stem Cell Factor*), un puissant stimulant de l'hématopoïèse [57]. En effet chez des souris mutantes pour le gène codant le *SCF*, on a observé : un pelage gris, une anémie microcytaire, une déficience en mastocytes et une stérilité [57]. D'autre part les souris mutantes pour le récepteur du *SCF* présentaient des zones focales hypopigmentées mais une hématopoïèse normale. Le traitement à base de *SCF* recombinant a induit une neutrophilie qu'à partir d'une dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ mais des doses quotidiennes de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ stoppaient les périodes de neutropénie. Un traitement combiné de *SCF* recombinant et de G-*SCF* recombinant canin (facteur de stimulation des granulocytes : G-CSF = *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) à des doses respectives de 20 à 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ et de 0,5 à 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ a montré une synergie des deux molécules. Un traitement à long terme était généralement bien toléré pour des doses allant de 10 à 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$ et paraissait être une bonne thérapie pour le traitement chronique de l'hématopoïèse cyclique du Colley. La figure 27 montre la disparition de la cyclicité de l'hématopoïèse avec un traitement au long cours.

Figure 27. Les effets du traitement d'un Colley gris atteint d'hématopoïèse cyclique

par le G-SCF et le SCF [62]



Légende : ces graphiques permettent d'apprécier la quantité de leucocytes (PMNS = *PolyMorphoNuclear leucocytes*) en fonction du temps et du traitement apporté :

- « *No treatment* » = aucun traitement,
- GSCF = *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*,
- SCF = *Stem Cell Factor*.

E. ANOMALIE D'ACTIVITÉ PROCOAGULANTE PLAQUETTAIRE

Cette anomalie d'activité procoagulante plaquettaire a été décrite pour la première fois chez le chien en 2002 par Brooks et collaborateurs [24]. Cette maladie possède de nombreuses caractéristiques présentes dans le syndrome de Scott, un défaut héréditaire rare d'activité procoagulante plaquettaire décrit en médecine humaine et fondé sur un déficit de mouvement de la phosphatidylsérine dans la

membrane thrombocytaire [24]. En effet, lors de son activation, la membrane des plaquettes subit de nombreux changements de conformation afin de pouvoir interagir avec divers facteurs de coagulation pour former des complexes tels que la ténase (IXa-VIIIa-) ou la prothrombinase (Va-Xa). Or ces facteurs ne sont capables de se fixer sur la membrane que si la charge locale est négative et c'est l'exposition de la phosphatidylsérine ainsi que sa libération dans des microvésicules qui permet ce changement de charge [24].

1. Description des cas

L'étude a porté sur 5 Bergers allemands adultes de la même lignée (3 femelles et 2 mâles) dont l'âge variait de 1,5 à 3 ans. Ces chiens présentaient des symptômes hémorragiques tels que des épistaxis, des hyphémas ou des saignements importants évocateurs de troubles de l'hémostase primaire lors de chirurgie mineure (développement d'hémoabdomen chez deux femelles suite à une ovariohystérectomie et développement d'un hématome scrotal suite à la castration chez un des mâles). Un mâle a également développé un hématome suite à une injection intramusculaire. Aucune autre anomalie en dehors des troubles de l'hémostase n'a été retrouvée lors de l'examen clinique.

Ces épisodes hémorragiques répondaient favorablement aux transfusions de sang frais.

Le fait que les mâles et les femelles soient touchés de manière équivalente suggère un mode de transmission autosomique.

Sur les différents chiens, le temps de saignement, l'hémogramme et la morphologie plaquettaire, les temps de coagulation, la rétraction du clou plaquettaire, la concentration en vWF:Ag et la distribution des multimères du facteur de von Willebrand avaient des résultats dans les normes. L'agrégation et la sécrétion plaquettaire ne présentaient aucune anomalie lors de l'étude de leurs réponses aux agonistes habituels. Ainsi aucune des maladies précédemment connues ne correspondait à ce cas.

2. Etude de l'activité procoagulante plaquettaire

a. Test de disponibilité du *Platelet Factor 3* (PF3)

Une suspension de plaquettes lavées appartenant à des chiens sains et à des chiens atteints a été mise en présence de kaolin puis le temps de coagulation a été mesuré. Il est apparu deux fois plus long chez les individus malades que chez les sains. La combinaison d'un plasma sain à des plaquettes anormales n'a pas permis d'obtenir un clou plaquettaire normal ce qui indiquait que le problème venait d'un défaut intrinsèque aux plaquettes [24].

b. Mesure de l'activité prothrombinase plaquettaire

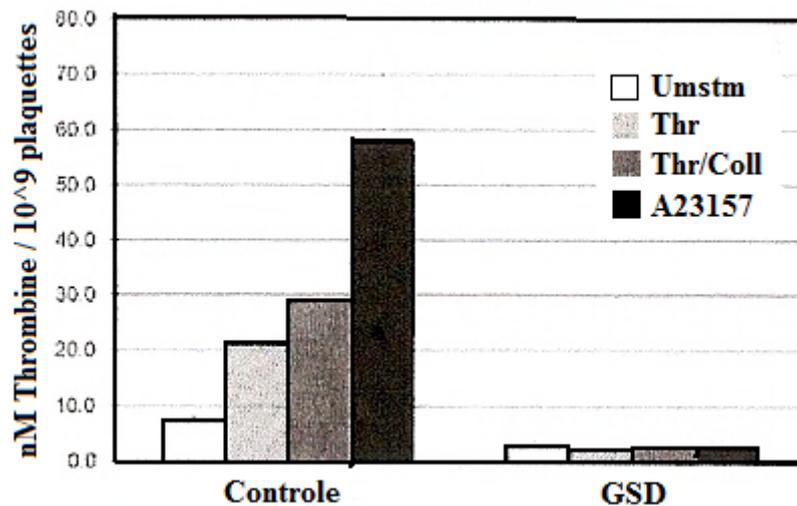
Une suspension de plaquettes lavées a été mise en présence de facteur X bovin et de prothrombine bovine. Des prélèvements réguliers ont permis de mesurer la quantité de thrombine générée grâce à son activité sur un substrat (mesure par variation de densité optique du mélange).

La quantité de thrombine générée chez les chiens normaux était maximale avec les ionophores de calcium, correcte avec la thrombine associée ou non au collagène et faible avec le diméthylsulfoxyde. Quant aux chiens atteints, très peu de thrombine a été synthétisée, quelque soit l'agoniste utilisé (Figure 28) [24].

La même technique a permis de mesurer l'activité prothrombinase des globules rouges sanguins où aucune différence significative n'a été notée entre chiens sains et malades.

Le manque d'activité prothrombinase des plaquettes n'a pas pu être attribué à une absence de phosphatidylsérine puisque les membranes de chiens atteints et de chiens normaux présentaient des quantités de phosphatidylsérine identiques [24].

Figure 28. Activité prothrombinase plaquettaire en réponse à un traitement agoniste [24]



Légende : l'activité prothrombinase mesurée en nmoles de thrombine / 10⁹ plaquettes est mesurée chez un chien sain (« contrôle ») et un chien atteint (GSD) en fonction de leur réponse à divers traitements agonistes : diméthylsulfoxyde (UnStm), thrombine (Thr), thrombine associée au collagène (Thr/Coll) et calcium (A23157).

c. Test de consommation de la prothrombine ou mesure du ratio prothrombine sérique

Des échantillons de sérum ont été mis en présence de fibrinogène bovin et les quantités initiales de prothrombine et après ajout de thromboplastine et de calcium ont été mesurées afin de déterminer le ratio prothrombine sérique : $\text{Ratio} = (\text{Prothrombine finale} / \text{Prothrombine initiale}) * 100$.

Plus il est élevé et moins la prothrombine est consommée. Ainsi le ratio pour un chien normal est inférieur à 60 % au bout d'une heure, contre 90 % pour un chien atteint d'une anomalie procoagulante plaquettaire.

Ce test a été utilisé sur les portées obtenues par croisement d'un mâle atteint et d'une femelle saine afin de déterminer le mode de transmission de la maladie. Sur les 3 portées obtenues, seuls 3 chiots sur 22 ont été détectés comme porteur. On a supposé ainsi un mode de transmission autosomique récessif de l'anomalie [24].

d. Cytométrie de flux

Alors que la quantité de phosphatidylsérine apparaissait normale dans les membranes plaquettaires de chiens atteints, la cytométrie de flux a révélé une diminution de l'exposition de la molécule ainsi qu'un défaut de formation des vésicules en réponse aux agonistes (ionophores de calcium, thrombine et collagène).

Les chiens atteints de cette anomalie procoagulante plaquettaire apparaissaient donc comme un modèle pour l'étude du syndrome de Scott, notamment pour déterminer l'origine de ces troubles.

Les tableaux 6 et 7 résument les caractéristiques cliniques, lésionnelles et génétiques des thrombopathies décrites précédemment.

Tableau 6. Diagnostic des thrombopathies constitutionnelles héréditaires (1ère partie).

Maladie		Rétraction du clou plaquettaire	Adhésion	Agrégation	Agrégation + agonistes	Sécrétion	Mode de transmission	Gène en cause ou suspecté (?)	Références
Anomalies des glycoprotéines membranaires	Thrombopathie de Glanzmann	Diminuée	Diminuée	Absente à diminuée	Absente à diminuée		Autosomique récessif	<i>ITGA2B</i> <i>ITGB3</i>	[9, 15, 172]
	Syndrome de Bernard Soulier	Diminuée	Diminuée	Absente en présence de ristocétine			Autosomique récessif	<i>GPIba</i> , <i>GPIbβ</i> , <i>GPIX</i>	[133, 141]
Anomalies du signal de transduction	Thrombopathie du Basset Hound	Normale	Diminuée	Absente à diminuée	Absente à diminuée	Diminuée	Autosomique récessif	<i>CalDAG-GEFI</i>	[10]
	Thrombopathie du Spitz	Normale	Diminuée	Absente à diminuée	Absente à diminuée	Diminuée	Autosomique récessif		
Absence de granules denses plaquettaires	Maladie du pool vide du Cocker	Normale		Diminuée	Diminuée pour ADP et collagène	Diminuée pour ADP	Autosomique récessif	<i>Rab27</i> , <i>Rab38</i> , <i>ABCC4</i> (?)	[36, 220]
	Syndrome de Chédiak-Higashi			Diminuée	Normale pour ADP et collagène	Absente	Autosomique récessif	<i>LYST</i> (?)	[127, 158, 166, 179]
Hématopoïèse cyclique du Colley gris		Diminuée		Diminuée	Diminuée sauf pour ADP		Autosomique récessif	<i>AP3</i>	[57, 61, 142, 8]
Anomalie d'activité procoagulante plaquettaire		Normale		Normale		Normale	Autosomique récessif		[24]

Tableau 7. Diagnostic des thrombopathies constitutionnelles héréditaires (2ème partie).

Maladie		Ultrastructure	Contenu des granules	Glycoprotéines membranaires	Métabolisme	Activité procoagulante plaquettaire
Anomalies des glycoprotéines membranaires	Thrombasthénie de Glanzmann	Normale	Diminution du fibrinogène	GP IIb/IIIa absents à diminués		Normale
	Syndrome de Bernard Soulier	Normale	Normal	GP Ib-V-IX absents à diminués		
Anomalies du signal de transduction	Thrombopathie du Basset Hound	Normale	Normal	Normal	Anomalie d'activité phosphodiesterase	
	Thrombopathie du Spitz	Normale		Normaux	Défaut précis non encore identifié	
Anomalies des granules denses plaquettaires	Maladie du pool vide du Cocker	Normale	Diminution de l'ADP	Normaux		
	Syndrome de Chédiak-Higashi	Absence de granules	Absent	Normaux		Diminuée (déficit en sérotonine et Mg ²⁺)
Hématopoïèse cyclique du Colley gris			Diminution de la sérotonine	Normaux	Défaut combiné de stockage de la sérotonine et de phosphorylation des protéines	
Anomalie d'activité procoagulante plaquettaire			Normal	Normaux		Diminuée

II. MALADIE DE VON WILLEBRAND

A. DÉFINITION ET ÉTIOLOGIE

La maladie de von Willebrand est considérée comme un défaut extrinsèque des plaquettes puisqu'elle est consécutive à un défaut quantitatif ou qualitatif en facteur de von Willebrand. Cette maladie a été décrite chez l'Homme pour la première fois en 1925 par un médecin finlandais, Erik Adolf von Willebrand [64]. C'est l'affection héréditaire de l'hémostase la plus répandue dans le monde (prévalence de 1 %). Elle est également appelée pseudo-hémophilie A en rapport avec les hémorragies caractéristiques des symptômes et il a fallu l'apparition des techniques modernes pour différencier les deux maladies.

Chez le Chien, c'est Dodds en 1970 qui a décrit le premier la maladie chez un Berger Allemand [59]. En 1978, des cas ont été rapportés chez le Golden Retriever, le Doberman, le Scottish Terrier et le Schnauzer nain ; la maladie était alors très fréquente (prévalence de 5 à 20 %) dans ces races certainement suite à l'utilisation importante de reproducteurs atteints ou porteurs. Des cas isolés ont aussi été décrits chez l'Épagneul, le Caniche nain, le Lhasa Apso ou le Cairn Terrier et depuis la maladie de von Willebrand est décrite dans de nombreuses races [206].

Chez le chat, elle reste anecdotique puisqu'un seul cas a été rapporté à ce jour dans la littérature, chez un Himalayen, variété de la race persane mais cette incidence faible pourrait être due à un manque de dépistage [68].

La classification de la maladie de von Willebrand en trois types a rapidement conduit la médecine vétérinaire à utiliser la classification humaine.

1. Les différents types de maladie de von Willebrand

Les observations de pedigrees atteints ont montré que les mâles et les femelles étaient atteints de manière égale ce qui signait une transmission autosomique. On distingue classiquement trois types de maladie de von Willebrand en fonction d'un déficit qualitatif (distribution des multimères) ou quantitatif. Selon le type, la transmission se fait de manière récessive ou dominante.

a. Type I

Le type I de la maladie de von Willebrand est le type le plus fréquemment rencontré et le moins grave. Ainsi la grande majorité des races dans lesquelles la maladie est présente sont touchées par ce type (Doberman, Berger allemand, Schnauzer nain, Berger des Shetland ...) [26, 163, 186, 188]. Cette forme se caractérise par un déficit quantitatif des différents multimères du vWF. En effet ils sont tous présents mais en quantité réduite. C'est une affection autosomique dominante à pénétrance incomplète ; ainsi les hétérozygotes porteurs de l'allèle dominant ne présentent pas toujours de symptômes malgré une déficience en facteur de von Willebrand. Il semblerait que l'homozygotie soit souvent létale avec des chiots mort nés ou qui meurent peu après la naissance [65]. Toutefois, Moser et collaborateurs, en 1996, ont étudié une population de Doberman et ont montré que ces individus étaient répartis en trois catégories en fonction de la concentration plasmatique en facteur de von Willebrand : les chiens avec une concentration en vWF:Ag > 75 %, ceux avec vWF:Ag comprise entre 30 et 75 % et ceux avec vWF:Ag < 30 % [163]. Ainsi la quantité de facteur produite dépendrait du nombre d'allèles fonctionnels, chaque allèle serait susceptible de produire la moitié de la quantité totale en facteur de von Willebrand, mais cette affirmation est controversée [65]. En 2000, Riehl et collaborateurs ont confirmé le mode de transmission autosomique dominant à pénétrance variable, chez le Doberman, et ont montré que l'homozygotie, pour la mutation causale, n'était pas létale [188].

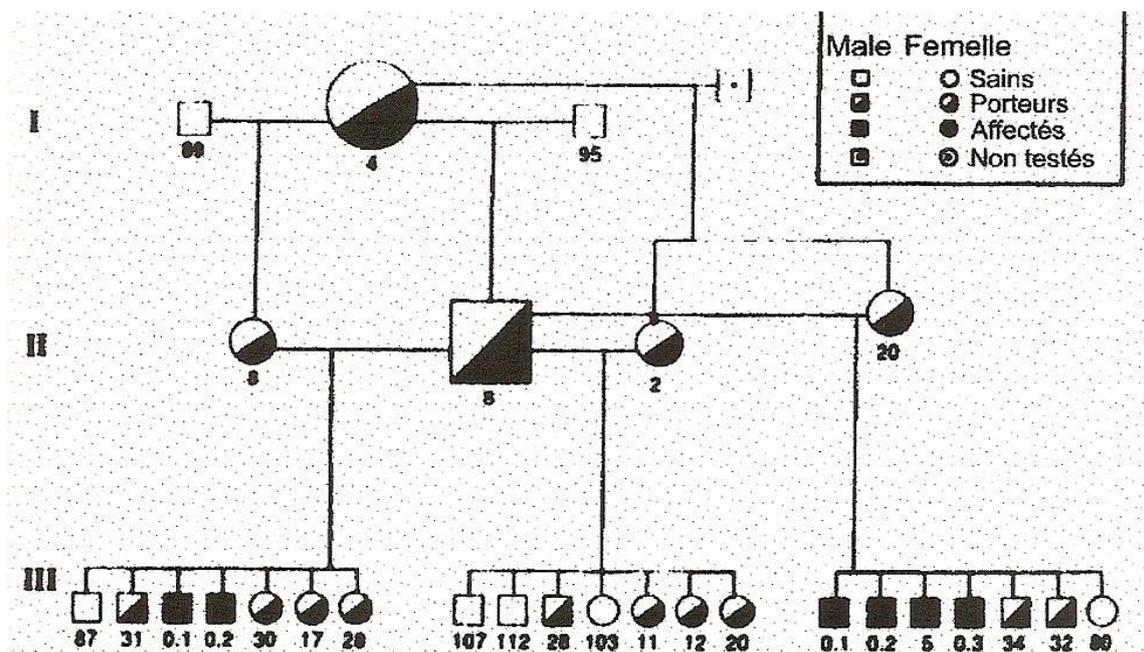
b. Type II

Le type II n'a, à l'heure actuelle, été identifié que chez le Pointer et le Drahtaar [31]. Dans cette forme on note un déficit en vWF:Ag, associé à une absence de multimères de poids moléculaire élevé. Ces multimères étant les plus efficaces, les signes cliniques de la maladie sont par conséquent en général sévères.

L'étude du pedigree d'une famille de Drahtaars a permis de montrer que les individus atteints n'avaient pas forcément de parents atteints ce qui est caractéristique d'une transmission récessive [31]. Les hétérozygotes se distinguaient par une absence de signe clinique, malgré une concentration en vWF:Ag en dessous des normes usuelles (Figure 29).

Figure 29. Pedigree d'une famille de Drahtaars où est présente la maladie de

von Willebrand de type II [31]



Légende : le chiffre situé sous chaque symbole correspond au pourcentage de la concentration en vWF:Ag.

Il est à noter que chez l'Homme, le type II est subdivisé en de nombreux sous-types en fonction de l'affinité du vWF avec la glycoprotéine GPIb ou le facteur VIII.

c. Type III

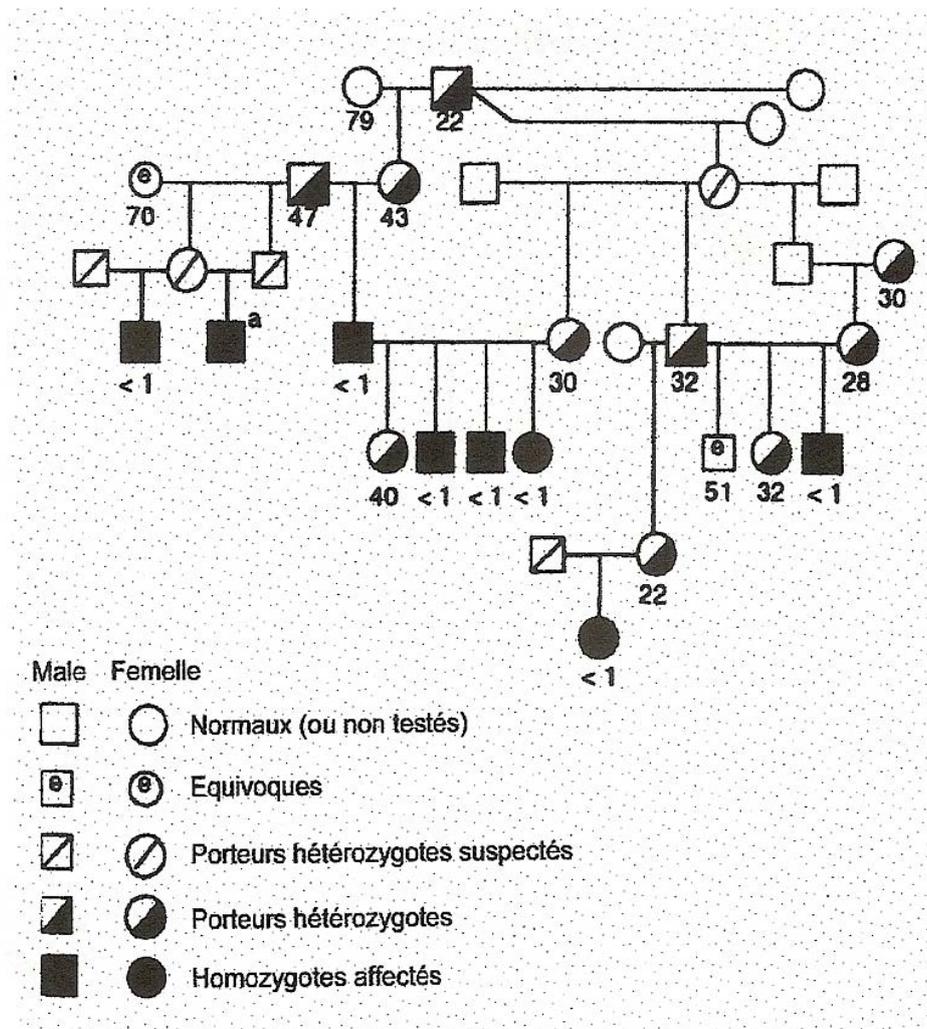
Le type III de la maladie de von Willebrand est le type le plus rare mais aussi le plus sévère. Des cas ont été décrits chez le Scottish Terrier, le Retriever de la baie de Chesapeake, le Berger des Shetland [178], le Drahtaar et le Kooiker Hollandais [187]. Dans cette forme, la concentration en vWF est indétectable chez les chiens malades.

L'étude du pedigree d'une famille de Scottish Terriers atteints a montré une transmission autosomique récessive (Figure 30).

Seuls les homozygotes présentaient des symptômes de diathèse hémorragique ; les hétérozygotes ne présentaient en temps normal pas de symptômes même si Stokol et collaborateurs, en 1995, ont décrit le cas d'un Scottish terrier hétérozygote présentant des symptômes [202].

Chez le Berger des Shetland, il a été montré que les chiens atteints du type III étaient en fait des homozygotes résultant du croisement de deux porteurs du type I [178, 186]. Les parents ne présentant pas de symptômes, il semble cependant probable que la maladie décrite chez le Berger des Shetland soit plus fréquemment de type III que de type I.

Figure 30. Pedigree d'une famille de Scottish terriers où est présente la maladie de von Willebrand de type III [202]



Légende : le chiffre situé sous chaque symbole correspond au pourcentage de la concentration en vWF:Ag.

d. Forme acquise chez l'Homme

Une forme acquise de maladie de von Willebrand a été identifiée chez l'Homme. Elle est identique cliniquement à la forme héréditaire mais apparaît de manière brutale chez un individu auparavant

sain. Il semblerait que le déficit soit lié à une affection concomitante comme une maladie auto-immune ou lymphoproliférative [101].

L'existence d'une telle forme chez le Chien est controversée mais l'hypothyroïdie est citée comme une cause possible (60 à 70 % des Dobermans hypothyroïdiens présenteraient un déficit en facteur de von Willebrand) [101]. Il est néanmoins difficile de savoir si l'apparition des symptômes n'est pas juste favorisée par cette endocrinopathie.

2. Etiologie

Le gène codant pour le facteur de von Willebrand est situé sur le chromosome 12 chez l'Homme ; la séquence du gène est connue depuis peu de temps chez le Chien, elle est portée par le chromosome 27 et comprend 85 % de nucléotides identiques à la séquence du gène présent chez l'Homme [128]. De nombreux polymorphismes du gène sont connus, qu'il convient de distinguer des mutations responsables de l'une ou l'autre forme de la maladie de von Willebrand. L'intervention de nombreux éléments de régulation complique également la compréhension du mécanisme génétique impliqué.

A ce jour, aucune mutation responsable de la maladie de von Willebrand de type I du Chien n'a été mise en évidence. Seuls des polymorphismes, associés à la maladie, ont été décrits chez le Doberman [27]. Cependant, le laboratoire Laboklin (www.laboklin.de) propose un test génétique pour le Doberman. Il n'a pas été possible de savoir sur quelle mutation, non encore publiée, repose ce test.

Kramer et collaborateurs, en 2004, ont montré que la maladie de von Willebrand de type II du Pointer et du Drahtaar était due à une substitution de base au niveau de l'exon 28 du gène codant pour le vWF. L'acide aminé asparagine est alors remplacé par un acide aminé sérine [128].

Les bases du mécanisme génétique aboutissant à la maladie de von Willebrand de type III ont été décrites par Rieger et collaborateurs, en 1998, dans une famille de Kooikers Hollandais dont quatre chiens étaient atteints [187]. Une substitution d'une base guanine en adénine au début de la région du site d'épissage de l'intron 16 (TGgtaagt → TGataagt) induit l'épissage anormal du gène avec conservation dans l'ARNm de 46 bases de l'intron 16 ce qui provoque un décalage du cadre de

lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré. Ce mécanisme a ensuite été confirmé par l'étude de Van Oost et collaborateurs, en 2004 [215]. Chez le Scottish Terrier, Venta et collaborateurs ont montré que c'était une délétion au niveau du gène qui provoquait la maladie [242]. Alors que Rieger et collaborateurs, en 1998, avait trouvé une mutation au niveau de l'exon 3 (208G->A) chez le Kooiker Hollandais, les études de Van Oost et collaborateurs, en 2004, ont montré que cette mutation était un simple polymorphisme génétique et que seule l'erreur d'épissage était responsable de la maladie dans cette race [187, 215].

Chez le Berger des Shetland, un test génétique est commercialisé, pour le type III, par les laboratoires Laboklin (www.laboklin.de) et VetGen (www.vetgen.com), cependant aucune mutation causale n'a encore été publiée pour cette forme, dans cette race. Le site du laboratoire VetGen indique que la mutation chez le Berger des Shetland a été découverte par l'université du Michigan et est protégée par un brevet (www.vetgen.com).

3. Epidémiologie

Depuis sa découverte chez le Chien en 1970, la maladie de von Willebrand a été décrite dans de nombreuses races avec une prévalence variable. De nos jours la maladie est rapportée chez plus de 50 races de chien. Un cas de maladie de von Willebrand a également été décrit chez un chat.

La maladie de von Willebrand est beaucoup décrite dans les pays anglo-saxons. Ainsi aux Etats-Unis la maladie est rapportée avec une prévalence supérieure à 15 % chez : le Basset Hound, le Berger Allemand, le Berger des Shetland, le Caniche, le Doberman, le Golden Retriever, le Spitz Loup, le Rottweiler, le Schnauzer nain, le Scottish Terrier, le Teckel, le Manchester Terrier et le Welsh Corgi. Mais elle est également présente à une prévalence inférieure à 15 % chez : l'Airedale Terrier, l'Akita Inu, l'Alaskan Malamute, le Bearded Collie, le Bouvier Bernois, le Bichon Frisé, le Bobtail, le Boxer, le Bulldog, le Cairn Terrier, le Cocker Américain et Anglais, le Colley, le Dogue Allemand, le Drahtaar, l'Epagneul Papillon, le Fox à poils durs / ras, le Greyhound, le Husky Sibérien, l'Irish Wolfhound, le Kuvasz, le Labrador Retriever, le Lakeland Terrier, le Lévrier Afghan, le Lhasa Apso, le Montagne des Pyrénées, le Pointer, le Retriever de la baie de Cheseapeake, le Samoyède, le Setter Anglais et Irlandais, la Shih Tzu, le Springer Anglais, le Skye Terrier, le Terrier Tibétain, le Vizsla, le Whippet et le Yorkshire Terrier [45]. Le tableau 8 présente les différentes races touchés par les trois formes de la maladie.

Tableau 8. Principales races concernées par les différents types de maladie de von Willebrand [45]

	Races chez lesquelles la maladie est décrite
Type I	Airedale Terrier, Akita Inu, Berger Allemand, Berger Shetland (23 %), Bouvier bernois, Cairn terrier, Caniche (moyen / nain), Doberman (58 à 65 % d'individus touchés aux Etats Unis), Golden Retriever, Greyhound, Irish Wolfhound, Kerry Blue Terrier, Manchester Terrier, l'Epagneul Papillon, Schnauzer nain, Setter Irlandais, Springer, Teckel, Welsh Corgi
Type II	Braque Allemand, Drahtaar
Type III	<u>Familial</u> : Berger Shetland, Kooiker Hollandais, Cheseapeake Bay Retriever, Scottish Terrier <u>Sporadique</u> : Border Collie, Bull Terrier, Cocker, Labrador Retriever, Loulou de Poméranie

En 2005 et 2008, le laboratoire d'analyse génétique VetGen (www.vetgen.com) donnait les statistiques suivantes pour plusieurs races vis-à-vis de la fréquence de la maladie de von Willebrand de type I et de type II (Tableau 9 et 10) :

Tableau 9. Fréquence des génotypes pour la maladie de von Willebrand de type I dans 5 races d'après www.vetgen.com, données de 2005

	Homozygote Sain	Hétérozygote Porteur	Homozygote muté
Bouvier Bernois	83 %	16 %	1 %
Doberman	25 %	49 %	26 %
Manchester Terrier	59 %	37 %	4 %
Welsh Corgi Pembroke	57 %	37 %	6 %
Caniche	90 %	9 %	1 %

Il convient de remarquer que les hétérozygotes porteurs ne sont pas indiqués comme pouvant exprimer des symptômes alors que la maladie de type I est autosomique dominante à pénétrance incomplète. D'autre part, il est indiqué par VetGen que ces 5 races portent la même mutation dans le gène du vWF, qui, à notre connaissance, n'a pas encore été publié.

Tableau 10. Fréquence des génotypes pour la maladie de von Willebrand de type III

chez le Scottish Terrier et le Berger des Shetland d'après www.vetgen.com, données de 2008

	Homozygote Sain	Hétérozygote Porteur	Homozygote muté
Scottish Terrier	89.7 %	10 %	0.3 %
Berger des Shetland	90.3 %	9.4 %	0.3 %

En France, une étude de 1998 portant sur 122 chiens a montré que la prévalence de la maladie était moins importante [189]. Toutefois le faible nombre de chiens étudiés ne permet aucunement de définir des normes pour la concentration en facteur de von Willebrand pour des individus normaux. En effet, la concentration de ce facteur varie énormément en fonction de facteurs raciaux, physiologiques ou pathologiques.

4. Symptômes

La maladie de von Willebrand est une maladie à forte morbidité mais à faible mortalité.

Néanmoins malgré le nombre important d'individus atteints, l'incidence des crises hémorragiques est relativement faible. La forme la plus commune est donc subclinique.

Anomalie de l'hémostase primaire, la maladie de von Willebrand se caractérise par des saignements muqueux et cutanés. Les épisodes hémorragiques varient de petits saignements auto-limitants à une diathèse hémorragique majeure pouvant être mortelle [114]. Les saignements mineurs sont pour autant de loin la manifestation clinique la plus fréquente.

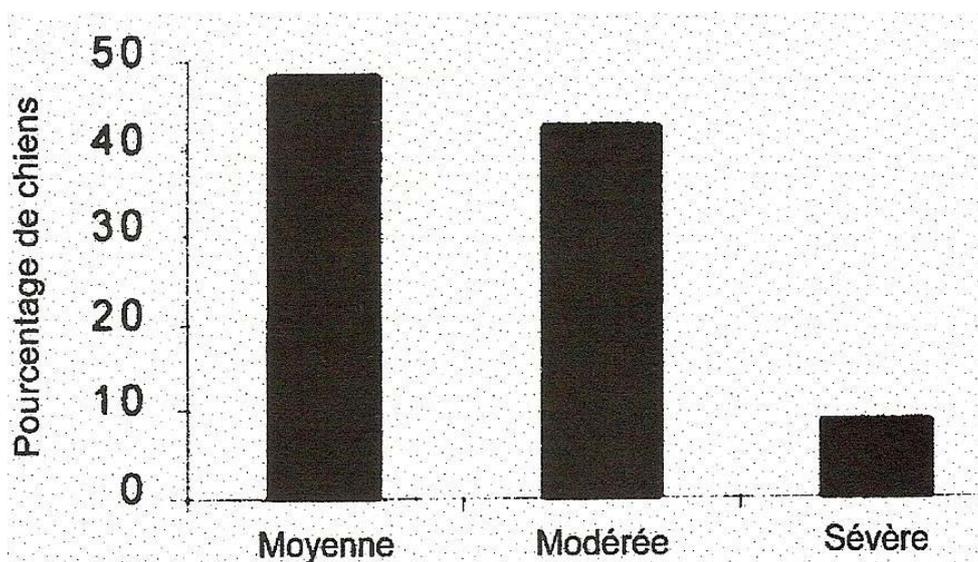
Dans les cas les plus sévères, les saignements sont spontanés la plupart du temps mais la majorité des animaux atteints présente des hémorragies excessives consécutives, soit à un traumatisme, soit à une opération chirurgicale (stérilisation, orectomie, caudectomie, retrait de dents, section du cordon ombilical, myélographie ...) [41]. L'étude d'une population de Doberman atteinte a montré en 1995 que 40 % des hémorragies étaient spontanées [67].

La sévérité des signes cliniques dépend du type de maladie. Ainsi dans le cas d'une maladie de von Willebrand de type III, l'absence totale de facteur de von Willebrand entraîne des épisodes hémorragiques sévères dont l'apparition est souvent spontanée. Cette forme de la maladie est la plus grave puisqu'elle peut conduire à la mort de l'animal.

De la même manière, la maladie de von Willebrand de type II, où la déficience sélective en certains multimères, qui sont généralement les plus efficaces, débouche sur des symptômes pouvant être du même ordre que pour le type III.

Le type I se différencie par des répercussions cliniques moins importantes. En effet l'atteinte biochimique est nettement moins importante puisque la concentration en vWF:Ag est mesurable et que la distribution des multimères est normale. Les hémorragies apparaissent, dans ce cas, après des traumatismes ou des opérations médicales (injection ou chirurgie). Stokol et collaborateurs ont étudié en 1995 l'intensité des saignements chez 89 dobermans affectés et ont montré que 48 % des saignements étaient moyens et 43 % modérés [202]. Seuls 8 animaux ont présenté des hémorragies sévères qui ont conduit à la mort de 2 chiens (Figure 31).

Figure 31. Distribution de l'intensité des symptômes cliniques observés sur une population de 89 dobermans affectés cliniquement [202]

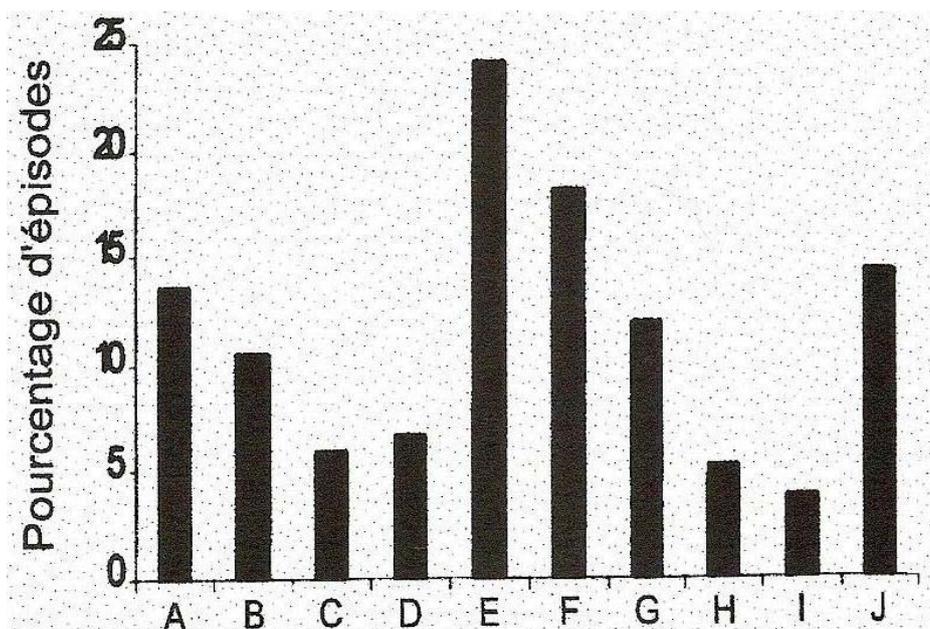


Légende : ce graphe montre le pourcentage de chiens (en ordonnées) pour chaque catégorie de gravité de signes cliniques, moyenne à sévère (en abscisse).

La localisation des saignements spontanés est très variable et dépend de la race mais aussi de l'individu. Stokol et collaborateurs ont étudié la distribution de la localisation des hémorragies et ont montré que chez le Scottish Terrier, le Berger des Shetland et le Doberman, les saignements du tractus urogénital prédominaient : hématurie, saignements vaginaux excessifs lors des périodes de chaleur ou en post-partum ou hémorragies péniennes [202]. Chez le Doberman, des saignements du tractus gastrointestinal, tels que des mélénas ou du sang en nature dans les selles, ont été fréquemment observés. De façon moins habituelle ont été rapportés des épisodes d'hyphémas, des

otites externes séro-hémorragiques ou une sévérité plus importante des signes associés à la parvovirose. La formation d'hématomes sous-cutanés ou intramusculaires suite à des injections, d'hémarthroses ou de saignements dans les grandes cavités plus spécifiques des défauts de facteur de la coagulation ont été très rarement rencontrés (Figure 32) [202].

Figure 32. Localisation et circonstances d'apparition des épisodes de diathèse hémorragique chez 89 Dobermans atteints de la maladie de von Willebrand [202]



Légende : le graphe présente le pourcentage d'épisodes de diathèses hémorragiques en ordonné par rapport, en abscisse, à la circonstance ou la localisation : **A : tractus uro-génital, B : tractus gastro-intestinal, C : cavités nasales, D : cavité orale, E : chirurgie, F : traumatismes, G : taille des ongles, H : hématomes sous-cutané, I : cavités corporelles, J : sites multiples.**

D'après Ringot en 1998, des symptômes plus rares ont été décrits dans la littérature comme : des boiteries mimant à la radiographie une panostéite éosinophilique, des réductions de fécondité associées à des résorptions embryonnaires, une mortalité néonatale avec des chiots présentant un tableau hémorragique majeur, des troubles nerveux variés suite soit à des hémorragies intracrâniennes soit à une hydrocéphalie secondaire à une hémorragie intraventriculaire et au thrombus en décollant qui gêne alors l'écoulement du liquide céphalo-rachidien [189].

Dodds, en 1970, a rapporté un syndrome connu uniquement chez les Dobermans atteints d'une déficience en vWF, appelé le syndrome coxofémoral spécifique [64]. Il se définit par l'apparition de masses composées de tissus osseux, cartilagineux et fibreux au niveau des muscles de la hanche ce qui entrave alors les mouvements de l'articulation coxofémorale. Cette ostéochondrofibrose est consécutive aux nombreux microsaignements consécutifs à la maladie de von Willebrand et qui participent à l'apparition d'une fibrose puis à la minéralisation des tissus mous.

Enfin les chiens atteints étudiés présentaient des complications de cicatrisation des plaies qu'elles soient chirurgicales ou traumatiques [64].

5. Diagnostic

a. Rappel : mesures de la quantité et de la qualité du vWF

L'expression clinique de la maladie de von Willebrand ne permet pas un diagnostic facile. Néanmoins chez les races prédisposées comme le Doberman, la suspicion intervient rapidement lors de troubles de l'hémostase chez un chiot. Il conviendra de différencier la maladie de von Willebrand, des thrombopathies héréditaires responsables, elles aussi, de troubles de l'hémostase primaire.

Lors de suspicion de troubles de l'hémostase, afin d'orienter le diagnostic, sont généralement réalisés, dans un premier temps, la mesure du temps de saignement buccal et du temps de coagulation. Dans le cas d'une maladie de von Willebrand, le temps de saignement buccal sera prolongé (voir 2^{ème} partie I.A.1.) comme c'est le cas dans tout trouble de l'hémostase primaire, mais le temps de coagulation sera lui normal.

La première approche de la maladie de von Willebrand consiste à rechercher un déficit quantitatif en vWF. Diverses techniques immunologiques permettent de déterminer la concentration en vWF:Ag (voir 2^{ème} partie I.C.1.a.). Il convient également de se rappeler que la concentration en vWF:Ag varie en fonction du temps et de divers facteurs ; aussi plusieurs dosages sont souvent nécessaires pour confirmer une maladie de von Willebrand. D'autre part en aucun cas ces méthodes ne permettent de mettre en évidence un trouble qualitatif du vWF.

Pour mesurer l'activité du vWF, il existe différents tests comme la mesure de l'agrégation et de l'activation plaquettaire en présence de ristocétine (voir 2^{ème} partie I.C.1.b.).

Enfin il est possible d'étudier la distribution des multimères afin de typer la maladie de von Willebrand (voir 2^{ème} partie I.C.1.c.) (Tableau 11).

Tableau 11. Caractéristiques biochimiques des 3 types de la maladie de von Willebrand [189]

	Concentration plasmatique en vWF:Ag	Distribution des multimères
Type I	Basse	Normale
Type II	Basse	Absence des multimères de poids moléculaires les plus élevés
Type III	Indétectable	Impossible à appréhender

b. Tests génétiques

La recherche des anomalies moléculaires au niveau du gène codant pour le facteur de von Willebrand est possible depuis que ce gène a été identifié chez le chien. Le développement des techniques d'amplification enzymatiques (PCR : *Polymerase Chain Reaction*) couplé à la mise en évidence de mutations causales dans le gène codant pour le vWF, a permis la mise en place de tests génétiques pour identifier les individus atteints ou porteurs.

α. Historique

Une première approche de ces méthodes, chez le Chien, a été décrite par Holmes et collaborateurs en 1996. Leur étude a permis la mise en évidence d'un microsattelite dans une région correspondant à l'intron 40 de l'Homme et qui possède deux allèles qui donnent par PCR des produits de 157 et 163 paires de bases. La corrélation de ces allèles avec la concentration en vWF:Ag a suggéré une association entre l'allèle à 163 paires de bases et la maladie de von Willebrand. Mais le statut des individus 157/163 et 163/163 n'a pu être clairement identifié. La faible représentation de cet allèle au sein de la population canine n'a, de plus, pas permis une utilisation de ce test comme méthode de diagnostic de la maladie de von Willebrand [104].

γ. Tests génétiques disponibles

Selon le type de maladie de von Willebrand, le test est disponible pour certaines races :

- Type I : Bouvier Bernois, Coton de Tuléar, Doberman, Drentsche Patrijshond (Epagneul à perdrix de Drente), Pinscher, Kerry Blue terrier, Manchester terrier, l'Épagneul Papillon, Welsh Corgi Pembroke, Caniche, Stabyhoun (Chien d'arrêt frison),
- Type II : Drahtaar, German Wirehaired Pointer, German Shorthaired Pointer, Pointer,
- Type III : Scottish Terrier, Berger des Shetland, Kooiker Hollandais.

Divers laboratoires commercialisent ces tests, dont le laboratoire américain VetGen (www.vetgen.com) dont nous avons évoqué les résultats précédemment. L'annexe 2 regroupe l'ensemble des tests génétiques disponibles pour la maladie de von Willebrand à l'heure actuelle.

6. Traitement

a. Médical

Le traitement médical est à mettre en place lorsque l'animal présente des saignements importants ou avant une opération chirurgicale, si la concentration en vWF est inférieure à 30 %.

α. Transfusion

L'avantage de la transfusion réside dans le fait qu'elle permet un apport direct en vWF et donc permet théoriquement de traiter les trois types de maladie.

➤ Sang total

La mise en place d'une transfusion chez un animal présentant une hémorragie importante permet de traiter momentanément le déficit en vWF. En pratique le sang total est facile à obtenir. Son utilisation est préconisée lorsque l'hématocrite est inférieur à 15 % à raison de 12 à 25 mL/kg toutes les 24 heures. La transfusion de sang total ne permet toutefois qu'un apport modéré de vWF et stabilise simplement le patient en attendant un traitement plus spécifique ; l'atteinte de quantités thérapeutiques est donc impossible sans risquer d'hypervolémie majeure. D'autre part, l'utilisation

répétée de sang total peut être à l'origine de réactions immunitaires c'est pourquoi des tests de compatibilité sont à réaliser avant toute transfusion de sang frais. Ces inconvénients ont amené à l'utilisation de composés sanguins plus sélectifs.

➤ Plasma frais ou congelé

L'utilisation de plasma permet d'éviter le problème de sensibilité liée aux protéines des hématies et d'augmenter la concentration en vWF sans toutefois arriver à obtenir des concentrations suffisantes pour avoir une dose thérapeutique sans hypervolémie. Ching et collaborateurs ont montré que l'apport de 450 mL de plasma frais à des Dobermans augmentait la quantité de facteur de von Willebrand en 30 minutes de 5 à 30 U/dL, sans modifier la pression sanguine systolique ou diastolique [46]. Le protocole conseillé est l'apport de 6 à 10 mL/kg toutes les 8 à 12 heures ou 30 minutes avant une opération chirurgicale.

➤ Cryoprécipité

Le cryoprécipité est un produit sanguin préparé à partir de plasma et enrichi en vWF (concentration vingt fois plus importante que dans le plasma), en facteur VIII et en fibrinogène. Il est obtenu par congélation du plasma puis réchauffement à 4°C ; il se forme alors un précipité. C'est le traitement médical de choix car il permet d'atteindre des doses thérapeutiques en vWF sans risquer d'hypervolémie ou de réactions immunitaires. Son coût et sa disponibilité limitent beaucoup son utilisation en médecine vétérinaire. Le protocole conseillé est l'apport d'1 unité (1 unité = quantité de cryoprécipité obtenu après le traitement de 200 mL de plasma) pour 10 kg en 10 à 15 minutes toutes les 6 à 8 heures [107].

β. Supplémentation hormonale

➤ Desmopressine

La desmopressine (ou 1 déamino-8-D-arginine vasopressine) est un analogue de synthèse de la vasopressine, une hormone antidiurétique. Elle entraîne une augmentation rapide et transitoire du facteur VIII:C et du vWF. L'augmentation de la concentration en vWF est consécutive à une augmentation de sa libération par les cellules endothéliales [93]. La capacité d'action de cette

molécule est donc limitée au cas où les cellules endothéliales sont aptes à libérer le facteur. Par conséquent ce traitement n'a aucun effet sur les maladies de von Willebrand de type II ou III.

L'administration intraveineuse de desmopressine provoque une élévation de l'activité du vWF rapide (environ 10 minutes à 1 heure) et sa demi-vie plasmatique est d'environ 6 heures. Cependant par rapport à l'Homme, le Chien a besoin d'une dose beaucoup plus élevée pour obtenir une augmentation significative. Johnstone et Crane préconisent ainsi une dose de 0,6 µg/kg pour une augmentation du taux basal de 98 % [113].

L'analyse multimérique montre que ce sont d'abord les multimères de haut poids moléculaire qui sont libérés en premier ce qui explique l'action rapide de la desmopressine [37]. Pour autant, l'utilisation de la desmopressine n'a qu'un intérêt restreint pour les chiens atteints de la maladie de type I notamment avant une opération chirurgicale. La dose conseillée est de 1 µg/kg en voie sous cutanée [37].

➤ Hormones thyroïdiennes

L'hypothyroïdie étant décrite comme une des causes susceptibles de favoriser l'apparition de la maladie de von Willebrand, la lévothyroxine pourrait s'avérer intéressante pour limiter les signes cliniques de la maladie. En 2005, Heseltine et collaborateurs ont évalué l'effet d'une prise quotidienne de 0,04 mg/kg en lévothyroxine toutes les 12 heures pendant 1 mois chez des Dobermans euthyroïdiens ayant une concentration en vWF:Ag inférieure à 15 % [101]. Les résultats ne montrent aucun effet sur la concentration en vWF par rapport aux chiens ayant pris un placebo [101]. La supplémentation des chiens atteints ne paraît donc pas intéressante.

Toutefois chez les animaux atteints et hypothyroïdiens, l'effet de la supplémentation serait positif sur le contrôle des saignements [101].

γ. Facteur de von Willebrand recombinant

L'utilisation de vWF recombinant chez des Kooikers Hollandais n'a montré aucun effet sur le temps de saignement mais a permis de limiter l'épistaxis de l'un des chiens atteints [211]. Son usage reste en tout cas du domaine de la recherche à l'heure actuelle.

δ. Thérapie génique

La maladie de von Willebrand étant causé par un gène unique, elle apparaît être une bonne candidate à la thérapie génique. Mais la grande longueur l'ADN complémentaire du facteur de von Willebrand (8,4 kilobases) ainsi que la complexité de la protéine ont longtemps ralenti les progrès de la recherche [60].

En 2006 a été décrit l'utilisation d'un lentivirus contenant l'ensemble du gène humain du vWF capable d'infecter les cellules endothéliales sanguines afin d'y induire la synthèse de ce facteur. Cette étude a été réalisée sur 4 Kooikers atteints de la maladie de von Willebrand de type III. Les résultats obtenus sont très encourageants et font de cette méthode une thérapie d'avenir [60].

b. Prévention

α. Individuelle

Afin de prévenir tous saignements majeurs, il convient d'éviter au maximum tout traumatisme chez les chiens que l'on sait atteints. Les prises de médicaments sont également à contrôler attentivement. Enfin lorsqu'un animal doit être opéré, l'administration de cryoprécipités ou de desmopressine (pour le type I) permet de limiter les saignements opératoires.

Le pronostic reste toutefois bon pour la maladie de von Willebrand de type I mais très défavorable pour les deux autres types.

β. Collective

La prévention de la dispersion de la maladie de von Willebrand au sein des différentes races passe par le retrait progressif de la reproduction des animaux atteints et porteurs de la mutation causale. L'utilisation des tests génétiques a ici toute son importance puisque les signes cliniques ne permettent pas de distinguer les individus porteurs. Aussi des programmes d'éradication de la maladie ont été mis en place dans certaines races comme le Manchester Terrier [189].

Le tableau 12 présente les caractéristiques des trois types de maladie de von Willebrand d'un point de vue des mutations à l'origine du type mais aussi du point de vue de leur diagnostic différentiel.

Tableau 12. Résumé des caractéristiques des différents types de maladie de von Willebrand

Type	Mutations	Concentration plasmatique en vWF:Ag	Distribution des multimères	Références
I	Inconnue	Basse	Normale	[65, 189]
II	Substitution au niveau de l'exon 28	Basse	Absence des multimères de poids moléculaires les plus élevés	[128, 189]
III	Substitution au niveau de l'intron 16 (Kooiker Hollandais) / Délétion (Scottish Terrier)	Indélectable	Impossible à appréhender	[188, 189]

QUATRIEME PARTIE :

**TROUBLES HEREDITAIRES DE LA
COAGULATION**

Les hémophilies A et B sont les deux principaux troubles héréditaires de la coagulation rencontrés chez les carnivores domestiques. Les déficits des autres facteurs, bien que plus rares, seront étudiés dans la partie III de ce chapitre.

Ces troubles héréditaires sont liés à l'absence ou à la moindre activité d'un ou de plusieurs des facteurs de la coagulation.

Lorsqu'un test génétique existe, pour chaque maladie concernée, il sera indiqué dans l'annexe 2.

I. HÉMOPHILIE A

A. GÉNÉRALITÉS SUR L'HÉMOPHILIE

1. Définition :

L'hémophilie A est due à une déficience quantitative ou qualitative de l'activité du facteur VIII:C, cofacteur intervenant dans la voie intrinsèque de la coagulation. On définit une hémophilie A⁻ en l'absence de ce facteur et une hémophilie A⁺ lorsque le facteur VIII est présent mais pas activé.

2. Importance de l'hémophilie A :

L'hémophilie A est le défaut de coagulation héréditaire le plus fréquent chez l'Homme et l'animal domestique (Chien, Chat, Cheval ...). Chez l'Homme, l'incidence est estimée entre 1 pour 10 000 à 1 pour 5 000 cas selon Mansell et collaborateurs (1992) et à 16 cas pour 100 000 hommes selon Stokol et collaborateurs (1994) [148, 203].

Le premier cas décrit chez le Chien l'a été chez un Setter Irlandais en 1946 [91]. La maladie est décrite dans de nombreuses races et chez de nombreux chiens croisés. D'après la base de données IDID (*Inherited Diseases In the Dogs*) de l'université de Cambridge (<http://server.vet.cam.ac.uk>), des cas d'hémophilie A ont été décrits dans les races suivantes : Akita Inu, Basenji, Basset Hound, Beagle, Berger Allemand, Berger Australien, Berger de Shetland, Bichon Frisé, Bobtail, Bouledogue Français, Bouvier Australien, Boxer, Boykin Spaniel, Braque Allemand, Braque

Hongrois, Bulldog, Cairn Terrier, Caniche, Chien d'eau Portugais, Chihuahua, Chow-Chow, Cocker Américain [165], Epagneul Breton, Golden Retriever, Labrador Retriever, Lhasa Apso, Manchester Terrier, Montagne des Pyrénées, Pit Bull Terrier, Pointer [118], Rottweiller, Saint Bernard, Schnauzer nain, Scottish Terrier, Setter Irlandais, Shar Peï, Shiba Inu, Siberian Husky, Spitz Allemand, Springer Anglais, Teckel, Welsh Corgi Pembroke, West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier [45]. Le Berger Allemand est particulièrement touché notamment en Europe (France, Allemagne, Danemark, Grande Bretagne, Norvège), au Canada et en Australie suite à l'utilisation comme reproducteur d'un étalon allemand hémophile, Canto von der Wienerau dans les années 1970 [91, 177]. L'incidence en France n'est pas connue mais les observations montrent qu'il s'agit d'un trouble souvent suspecté.

Les cas d'hémophilie A sont plus rares chez le Chat ou moins rapportés. Des cas ont été décrits chez l'Abyssin, le Domestic Longhair, l'American Shorthair, le Havana, l'Himalayen (Persan *colourpoint*) et le Siamois [55, 113, 116, 137].

3. Mode de transmission :

L'hémophilie A est une maladie héréditaire liée au sexe, à déterminisme mendélien [148]. Les structures génétiques codant pour la synthèse, le contrôle et la régulation de la synthèse du facteur VIII sont portées par le chromosome X. Le gène existe sous deux formes : un allèle normal dominant (X) et un allèle anormal récessif (X^h).

Ce mode de transmission récessif lié au chromosome X explique que dans la majorité des cas les animaux atteints sont des mâles et que les femelles sont des porteurs asymptomatiques. Les cas de femelles hémophiles viables sont rarissimes ; celles-ci devant en effet recevoir un allèle anormal de chacun de ses parents [148, 165].

Plusieurs croisements sont possibles avec des conséquences variables sur la portée :

1) Cas du croisement d'un mâle hémophile et d'une femelle saine :

$(XX) \times (X^hY) \Rightarrow 50\%$ de (XX^h) soit toutes les femelles de la portée porteuses saines

50% de (XY) soit tous les mâles de la portée sains

2) Cas du croisement d'un mâle hémophile et d'une femelle porteuse :

$(X^hX) \times (X^hY) \Rightarrow 25\% \text{ de } (X^hX^h) \text{ soit } 50\% \text{ des femelles de la portée hémophiles (si viables)}$
25 % de (X^hX) soit 50 % des femelles de la portée porteuses saines
25 % de (X^hY) soit 50 % des mâles de la portée hémophiles
25 % de (XY) soit 50 % des mâles de la portée sains

3) Cas du croisement d'un mâle hémophile et d'une femelle hémophile :

$(X^hX^h) \times (X^hY) \Rightarrow 100\% \text{ de } (X^hX^h) \text{ soit } 100\% \text{ des femelles de la portée hémophiles (si viables)}$
100 % de (X^hY) soit 100 % des mâles de la portée hémophiles

4) Cas du croisement d'un mâle normal et d'une femelle porteuse :

$(X^hX) \times (XY) \Rightarrow 25\% \text{ de } (X^hX) \text{ soit } 50\% \text{ des femelles de la portée porteuses}$
25 % de (XX) soit 50 % des femelles de la portée saines
25 % de (X^hY) soit 50 % des mâles de la portée hémophiles
25 % de (XY) soit 50 % des mâles de la portée sains

5) Cas du croisement d'un mâle normal et d'une femelle hémophile :

$(X^hX^h) \times (XY) \Rightarrow 50\% \text{ de } (X^hX) \text{ soit } 100\% \text{ des femelles de la portée porteuses saines}$
50 % de (X^hY) soit 100 % des mâles de la portée hémophiles

En pratique le cas le plus fréquent est le cas 4 ; en effet les femelles porteuses de l'allèle anormal sont asymptotiques, l'allèle étant récessif, et donc en l'absence de recherche d'une hémophilie A éventuelle il est impossible d'identifier ces femelles porteuses et donc de les retirer de la reproduction. Par conséquent la plupart des mâles hémophiles proviennent de ce type de croisement. De plus, dans ce cas, 50 % des filles seront porteuses. Les cas de femelles homozygotes sont rares et un seul cas a été décrit dans une famille de chien dans laquelle l'hémophilie A était discrète. Les autres cas de femelles homozygotes rapportées proviennent de colonies établies pour la recherche sur l'hémophilie A [18].

Le cas 1 correspond au cas d'un Berger Allemand hémophile, Canto von der Wienerau utilisé comme étalon dans les années 70 (voir 2) et dont l'utilisation dans de nombreux croisements est à l'origine de la dissémination de l'hémophilie A en Europe, en Australie et au Canada.

A la vue des nombreuses conséquences sur les portées de la présence de l'allèle anormal chez les parents, il apparaît important de connaître le génotype des parents et de savoir diagnostiquer l'hémophilie A afin d'écarter les porteuses éventuelles de la reproduction.

4. Les mutations dans l'hémophilie A [121]:

De très nombreuses mutations ont été décrites dans le gène codant pour le facteur VIII, chez l'Homme [30, 143, 223]:

- mutations ponctuelles,
- délétions d'une partie du gène,
- insertion de plusieurs kilobases,
- inversion par recombinaison chromatinienne entre séquences homologues pouvant entraîner une modification de la structure du gène.

Chez le Chat, aucune mutation causale n'a été identifiée jusqu'à présent, alors que, chez l'Homme, plus de 900 mutations différentes ont été identifiées jusqu'à présent [30]. Chez le Chien, deux groupes ont rapporté que l'inversion de l'intron 22 serait la mutation causale chez le Setter Irlandais [143] et dans la colonie de Schnauzers nains hémophiles de la Queen's University au Canada [106].

B. SYMPTÔMES ET DIAGNOSTIC DE L'HÉMOPHILIE

1. Manifestations cliniques :

Les symptômes de l'hémophilie A sont dus aux conséquences de manifestations hémorragiques plus ou moins sévères ; celles-ci dépendant beaucoup de l'activité du facteur VIII:C. L'expression clinique de cette maladie dépend donc du pourcentage en facteur VIII:C plasmatique de l'animal hémophile que l'on peut rapporter au pourcentage en facteur VIII chez un animal normal (Tableau 13) :

Tableau 13. Classification clinique de l'hémophilie A chez le Chien [136]

	F VIII:C plasmatique % / animal normal	Manifestations cliniques
Hémophilie sévère	< 1 %	Hémorragies sévères après un traumatisme. Hémarthroses spontanées et hémorragies musculaires. Hémorragies internes pouvant mettre en jeu la vie de l'animal.
Hémophilie modérée	1 à 10 %	Hémorragies sévères après un traumatisme important ou une chirurgie. Petites hémorragies suite à un léger traumatisme. Hémarthroses occasionnelles et saignements spontanés
Hémophilie mineure	10 à 20 %	Saignements uniquement après un traumatisme important ou une chirurgie

Stokol et collaborateurs (1994) ont présenté une autre classification fondée sur l'activité du facteur VIII:C ; la référence utilisée pour un chien normal étant située entre 56 et 180 unités canines par décilitre (CU/dL) (Tableau 14) [203].

Tableau 14. Classification de l'hémophilie A canine d'après Stokol et collaborateurs 1994 [210]

	Activité du F VIII:C plasmatique par rapport à la normale	Manifestations cliniques
Hémophilie sévère	< 1 %	Hémorragies sévères après un traumatisme. Hémarthroses spontanées et hémorragies musculaires. Hémorragies internes pouvant mettre en jeu la vie de l'animal.
Hémophilie modérée	1 à 10 %	Saignements sévères après un traumatisme important ou une chirurgie. Hémarthroses occasionnelles et hémorragies « spontanées »
Hémophilie mineure	10 à 20 %	Saignements uniquement après un traumatisme important ou une chirurgie

Ainsi dans les cas les plus sévères (moins de 1 % d'activité du facteur VIII), les premiers symptômes apparaissent très rapidement après la naissance et dans certains cas sont responsables de mort prématurée dans les premières semaines de la vie [7]. Cependant dans les cas les moins graves, les premières hémorragies n'apparaissent que chez des animaux adultes notamment chez le Chat, animal plus agile et parfois confiné à l'intérieur des appartements et maisons [55].

Le premier symptôme mis en évidence dans les cas grave d'hémophilie A est une persistance du saignement du cordon ombilical. Les premiers déplacements du chiot et du chaton sont les moments d'apparition des premières hémorragies consécutives à divers traumatismes. Toutefois aucun passage transplacentaire de facteur VIII n'a pu être mis en évidence pour expliquer l'absence des symptômes avant les premiers déplacements. L'augmentation de l'activité semble être la seule hypothèse pour expliquer ces hémorragies. Il semblerait également que les chiens âgés soient moins exposés aux traumatismes, grâce à une adaptation comportementale [51].

Chez le chiot, l'éruption des dents définitives ou la première vaccination peuvent également être à l'origine de crises hémorragiques. En effet l'utilisation de vaccin vivant induit des anomalies quantitatives et/ou qualitatives plaquettaires 2 à 7 jours après l'injection. Ce phénomène passe inaperçu chez les animaux en bonne santé mais dans le cas d'un défaut d'hémostase cet effet peut suffire à causer une hémorragie importante [113].

Suite à certains actes chirurgicaux considérés comme mineurs (castration, coupe de queue ...) des hémorragies ont été rapportées après les opérations, notamment lors de castration chez le Chat chez qui sont rapportés des saignements 12 à 36 heures après l'intervention voir des hématomes abdominaux suite à la rétraction des vaisseaux spermatiques [55].

Les hématomes sous-cutanés ou intramusculaires sont le signe le plus fréquent lors de l'hémophilie A [73]. Ceux-ci sont généralement d'origine traumatique ou iatrogène (injections diverses) et permettent ainsi la découverte fortuite de la maladie lors de la visite chez le vétérinaire.

Les hématomes musculaires sont très fréquents chez les animaux hémophiles et sont responsables de douleurs plus ou moins importantes qui amènent les propriétaires de ces animaux à consulter le vétérinaire traitant pour des boiteries [118]. L'apparition de masses fluctuantes de taille parfois importante est également souvent un motif de consultation ; la localisation est très variable (thoracique, abdominale, faciale, ...) [7].

D'autre part, des saignements gastro-intestinaux sont parfois présents : coloration sanguine des selles, méléna, vomissements de sang frais ou digéré ... Les épistaxis sont moins fréquentes chez

l'animal que chez l'Homme. Chez les femelles hémophiles, des saignements utérins post-partum peuvent causer la mort. Enfin des saignements urinaires ont aussi été rapportés [7].

Les hémarthroses sont fréquemment rencontrées chez le Chien ; ces hémorragies ne sont pas sans conséquences délétères sur le fonctionnement articulaire. Elles entraînent des boiteries ou des hypertrophies articulaires. Ainsi, lors de boiteries intermittentes, une hémophilie est à suspecter. Des hémorragies épidurales (autour de la moelle épinière) peuvent induire une compression de cette dernière et sont alors responsables d'ataxie, de déficits moteurs allant du déficit proprioceptif à la paralysie.

Les hémorragies internes ont été rapportées mais leur diagnostic est difficile précocement ; l'apathie, l'anorexie ou la dysorexie sont généralement les seuls symptômes que présentent l'animal dans un premier temps. Des hémorragies pulmonaires consécutives à la migration des larva migrans, des hémorragies pleurales ou des hémorragies diffuses du cou et du médiastin sont parfois à l'origine de détresse respiratoire majeure conduisant éventuellement à la mort de l'animal [183].

Associée à ces désordres sanguins, une anémie peut se mettre en place soit brutalement dans le cas d'une hémorragie aiguë importante (l'anémie sera alors normocytaire, normochrome et régénérative) soit de manière chronique en cas d'hémorragies fréquentes (elle sera alors microcytaire, hypochrome et faiblement régénérative). Un ictère apparaît parfois, notamment après la formation d'un hématome de taille importante.

La corrélation, chez le Chien, entre les signes cliniques observés et l'importance du déficit en facteur VIII:C ne semble pas vérifiée chez le Chat. Certaines observations cliniques laissent penser que l'expression clinique de l'hémophilie A est moins sévère chez le Chat [55].

2. Diagnostic :

a. Clinique et biologique

Lors de tout désordre de l'hémostase, un bilan sanguin comprenant une numération et une formule sanguine, une mesure du temps de Quick, une mesure du temps de céphaline activée, une mesure du temps de saignement et une mesure du temps de thrombine est à réaliser.

L'hémogramme ne montre généralement qu'une thrombocytose ; toutefois une anémie est parfois mise en évidence [131].

Lors d'hémophilie A, le temps de Quick n'est pas modifié ce qui montre que la voie extrinsèque ou la voie commune de la coagulation ne sont pas touchées. Attention néanmoins aux modifications du temps de Quick qui sont, dans de rares cas, un indicateur d'un second problème notamment une maladie de Von Willebrand parfois associée dans certains cas à cette maladie [90].

Le temps de céphaline activée est prolongé lors du déficit en facteur VIII, puisque ce dernier intervient dans la voie intrinsèque de la coagulation et son activité réduite affaiblit la formation du caillot.

Une fois que le prolongement du TCA est mis en évidence et afin de savoir de quel facteur vient le déficit il est nécessaire de mesurer chacun de ces facteurs (VIII, IX, XI, XII). En pratique seuls les facteurs VIII et IX sont testés en première intention, les hémophilies A et B étant les troubles les plus fréquents dans cette situation.

Le dosage différentiel de l'activité du facteur VIII est réalisé à l'aide de méthodes chronométriques utilisant soit un plasma commercial d'hémophile humain sévère (donc très pauvre en facteur VIII:C) soit un plasma de Chien (ou de Chat) déficient en facteur VIII (COATEST Kit) [147, 181]. Il convient néanmoins de faire attention à la différence majeure qui existe entre les pourcentages d'activité du facteur VIII:C de l'Homme et du Chien. Ainsi un chien peut présenter 100 % d'activité en système humain mais seulement 10 % dans l'espèce canine. Il faut donc toujours rapporter les valeurs d'activité du facteur VIII:C à celle d'un chien témoin. Ce dosage permet le diagnostic et précise l'intensité du déficit en comparant le plasma du malade à un animal sain (ou

mieux à plusieurs animaux). Ainsi Langdell et collaborateurs, en 1953, ont proposé la méthode suivante : 0,1 mL de plasma du patient hémophile sont ajoutés à 0,1 mL de citrate et à 0,1 mL du plasma test dilué au cinquième ou 0,1 mL de plasma de chien normal dilué au 1:5, au 1:40, au 1:80, au 1:200 et au 1:500 [132]. Après 6 secondes d'incubation, 0,1 mL de CaCl₂ M/4 sont ajoutés et le temps de coagulation est mesuré (apparition d'un caillot). Les résultats permettent alors de donner une idée de l'activité du facteur VIII:C.

Le dosage immunologique du facteur VIII:Ag par un test ELISA non spécifique donne des résultats comparables à ceux obtenus par les méthodes chronométriques [91]. 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*) [189]. L'application au Chien n'a pas été retrouvée durant nos recherches.

Néanmoins dans le cas d'une maladie de von Willebrand on observe la même diminution d'activité du facteur VIII:C. Mais dans la maladie de von Willebrand on observe également une adhésion et une agrégation plaquettaire anormale. Aussi il existe plusieurs méthodes pour différencier ces deux maladies :

- un test d'agglutination à la ristocétine des plaquettes. *In vitro* le facteur de von Willebrand ne réagit pas spontanément avec les plaquettes. L'intervention d'un modulateur exogène, la ristocétine, un antibiotique glycopeptidique induit un changement de conformation du facteur de von Willebrand conduisant à une agglutination des plaquettes [16],
- un test au polybrène (bromide de hexasdiméthrine) qui utilise le même principe que le test précédent [92],
- un test au venin de *Bothrops jararaca* (une vipère d'Amérique du Sud). Des études ont montré que de nombreux venins de serpent, notamment de l'espèce *Bothrops jararaca* sont à l'origine d'une coagulation sanguine majeure sauf en l'absence de facteur de von Willebrand [92]. Ce test consiste donc à vérifier la présence d'une agglutination plaquettaire en présence de ce venin.

On comprend donc qu'un résultat normal ou augmenté (agglutination plaquettaire) est signe d'une hémophilie A [55]. Le calcul d'un ratio entre l'activité du facteur VIII et la concentration de l'antigène du facteur de von Willebrand peut être utilisé pour détecter les porteurs de l'hémophilie A [149].

Le dosage du facteur VIII:C présente un intérêt particulier en médecine humaine où il permet, suite à la ponction de sang fœtal dans le cordon ombilical, un diagnostic prénatal d'hémophilie A. Devant la complexité technique de cette ponction, cette méthode n'est pas utilisée en médecine vétérinaire.

b. Génétique

Un panel de marqueurs microsatellites du facteur VIII a été développé afin de permettre une détection génétique de l'hémophilie A chez le Chien. En 2005, Brooks et collaborateurs ont fondé la détection des chiens porteurs (des Golden Retrievers) sur la ségrégation d'un seul marqueur, *cF8ms* [28].

Brooks et collaborateurs, en 2008, ont étudié, chez 78 chiens représentant 14 races (Border Collie, croisé Border Collie, Border Terrier, Chihuahua, Grand Danois, Jack Russel Terrier, Loulou de Poméranie, Chien d'eau Portugais, Carlin, croisé Carlin/Terrier, Colley Barbu, Saint Bernard, Samoyède, croisé Terrier), 6 marqueurs intragéniques du facteur VIII, situés sur la partie 5' du gène et dans les introns 6, 10, 12, 14 et 21. En effet, l'étude a montré que le génotype basé sur un seul marqueur n'est pas suffisamment indicatif pour beaucoup de races. Les résultats ont montré une hétérogénéité allélique de l'hémophilie A canine mais l'utilisation d'un panel de trois marqueurs est intéressante pour faciliter la détection des porteurs de la maladie [30].

A ce jour, aucun laboratoire ne commercialise de test génétique chez le Chien pour la détection de l'hémophilie A.

C. TRAITEMENT :

1. Médical :

a. Tranfusion :

Pour stopper un saignement et limiter ses effets, il faut que le taux plasmatique de facteur VIII:C se maintienne à des valeurs de l'ordre de 20 % de la normale. Aussi le traitement des hémorragies requiert généralement une transfusion de sang frais total, de plasma ou de concentrés plasmatiques. Le sang est récolté auprès d'un animal donneur pour être utilisé immédiatement ou après

conservation au frais, l'efficacité thérapeutique étant décrite comme étant la même [64]. Il est généralement recommandé de transfuser 6 à 10 mL de plasma frais par kilo de poids vif 2 à 3 fois par jour (le facteur VIII ayant une demi-vie de 6 à 14 heures) pendant 2 à 3 jours en fonction de l'importance des symptômes et de continuer jusqu'à ce que les saignements stoppent. Les conditions classiques d'une transfusion sont décrites dans l'annexe 1. L'utilisation de plasma pour la transfusion est plus efficace que l'utilisation de sang frais car d'une part le plasma contient plus de facteur VIII par unité de volume et d'autre part l'animal receveur peut se sensibiliser au contact du sang du donneur (apparition d'anticorps anti-VIII) et par conséquent des complications peuvent survenir à la prochaine transfusion [64]. Lors d'anémie marquée, la transfusion de sang total est néanmoins plus indiquée pour rétablir la volémie et apporter des globules rouges.

Toutefois la disponibilité de l'équipement pour la centrifugation, la séparation et la conservation du plasma fait que transfuser du plasma frais est impossible en pratique courante et l'utilisation de sang frais est une bonne alternative. La conservation au frais pendant plusieurs jours de sang frais peut dégrader celui-ci et diminuer l'efficacité de la transfusion [55].

Dans le cas d'un hématome intramusculaire une seule transfusion de plasma peut suffire pour le traitement.

Les concentrés de facteur VIII existent mais ne sont pas disponibles en pratique. Par contre sont utilisables les cryoprécipités qui sont des concentrés de facteur VIII, de fibrinogène et de vWF obtenus à partir du plasma [131].

b. Thérapie génique :

a. Intérêt :

Les patients présentant une activité du facteur VIII:C inférieure à 1 % souffrent d'hémorragies très sévères, responsables d'une morbidité et d'une mortalité importante si la maladie n'est pas traitée. De plus, le passage à une activité du facteur VIII:C de 1 à 5 % permet de passer d'une hémophilie sévère à une hémophilie modérée. L'utilisation de dérivés sanguins ou de facteur VIII recombinant n'est pas sans défaut : la demi-vie plasmatique du facteur VIII est faible et le coût du traitement (150 000 \$ par an) est très élevé [111].

La thérapie génique est apparue comme une solution alternative intéressante pour soigner les animaux atteints d'hémophilie A.

β. Les différentes thérapies :

Le gène codant pour le facteur VIII a été cloné et des vecteurs pour le transfert de l'ADN complémentaire du gène ont été développés. Des adénovirus ou des rétrovirus modifiés ont été le plus souvent employés pour contenir le gène. Les cellules cibles pour les modifications génétiques en vue de la production de molécules antihémophiliques sont les cellules hépatocytaires, les cellules musculaires, les cellules endothéliales, les kératinocytes ou encore les fibroblastes [53].

L'essentiel des études menées chez le Chien a été fait à l'aide de vecteurs ciblant les hépatocytes et contenant le gène ou une portion du gène codant pour le facteur VIII sous contrôle d'un promoteur hépatique.

La thérapie peut se faire soit par la réimplantation de cellules modifiées en culture chez le donneur (méthode *ex vivo*) soit par délivrance du vecteur directement dans les cellules cibles (méthode *in vivo*).

La méthode *ex vivo* donne généralement des sécrétions faibles *in vitro* et indétectables *in vivo* [53] même si certaines études ont permis d'obtenir des sécrétions thérapeutiques pendant quelques temps chez la Souris. Mais les manipulations cellulaires en laboratoire et la réimplantation sont des limites à l'utilisation en pratique courante de cette technique.

Pour tester la méthode *in vivo*, Connelly et collaborateurs ont injecté à des chiens atteints d'hémophilie A par voie intraveineuse une solution contenant un adénovirus recombiné contenant le gène du facteur VIII humain sous contrôle d'un promoteur hépatique [53]. Ils ont montré une correction phénotypique de l'hémophilie (normalisation des temps de coagulation). La mesure des taux de FVIII:C ont montré des doses thérapeutiques dans le plasma des chiens. Néanmoins l'effet positif ne fut présent que durant une à deux semaines suite au développement d'anticorps anti-FVIII:C humain [53]. L'étude de la toxicité éventuelle de la thérapie génique par Chuah et collaborateurs, en 2003, chez la Souris et le Chien, n'a pas permis de mettre en évidence d'effets secondaires possibles tels qu'une thrombocytopénie, une anémie, une élévation du taux d'interleukines pro-inflammatoires (IL-6) ou une hépatotoxicité [51]. Gallo-Penn et collaborateurs ont néanmoins mis en évidence une baisse transitoire du nombre de plaquettes juste après l'injection du vecteur. Dans leur étude, ils ont également mis en évidence des anomalies hématologiques et une toxicité hépatique [79].

Afin de permettre une efficacité plus longue dans la durée, Scallan et collaborateurs ont utilisé un virus adéno-associé de type 2 (AAV-2) qui présente l'avantage d'une expression persistante dans l'organisme mais l'inconvénient de ne pouvoir incorporer qu'une faible quantité de matériel génétique alors que le gène du facteur VIII est grand [193]. L'utilisation d'un élément régulateur pour permettre l'expression d'une forme délétée d'un domaine du facteur VIII:C, a permis une correction partielle de l'hémophilie sur une longue durée [209]. Une étude de Sarkan et collaborateurs, en 2004, a comparé l'efficacité des virus adéno-associés de type 2, 5, 7 et 8 et a déterminé que le vecteur le plus efficace semblait être l'AAV-8 [192]. Les études de Brown et collaborateurs, en 2004, et de Jiang et collaborateurs, en 2006, ont confirmé que l'utilisation de la méthode *in vivo* est la méthode la plus intéressante pour un traitement au long cours de l'hémophilie A [32, 111].

Une autre méthode développée par Shi et collaborateurs [197] et rapportée par High et collaborateurs a consisté à utiliser les plaquettes comme transporteurs du facteur VIII en incorporant le gène codant pour ce facteur au sein des cellules hématopoïétiques. L'expression de facteur VIII, par les thrombocytes, avec un stockage dans les granules α , possédait l'avantage de délivrer ce facteur directement au site d'hémorragie. Pour le moment cette technique n'a été développée que dans le modèle Souris [102, 197].

Il existe ainsi de très nombreux essais de thérapie génique concernant l'hémophilie A. Le Chien constitue un excellent modèle pour l'étude de ces stratégies thérapeutiques et permettra peut être un jour d'aboutir à une correction efficace, stable et sans effet secondaire, du défaut en facteur VIII chez l'Homme.

c. Transplantations :

α. Greffe de cellules de moelle osseuse [204]

En médecine humaine, la greffe de moelle a montré des résultats positifs dans le traitement de l'hémophilie A. En 1972, Storb et collaborateurs ont essayé de greffer de cellules de moelle osseuse de chien normal sur des chiens atteints d'hémophilie A, afin de mesurer l'activité du facteur VIII:C. Contrairement à ce que montrait certaines études (production de facteur VIII:C par les lymphocytes *in vitro* – augmentation de l'activité du facteur VIII:C chez des chiens hémophiles à leucémie lymphoblastique), cela n'a pas été observé. Il semblerait donc que la

synthèse de facteur VIII:C par les lymphocytes soient inexistantes chez le Chien contrairement à ce qui a été observé chez l'Homme.

β. Transplantation hépatique :

Les maladies métaboliques du foie telles que l'hémophilie peuvent, en théorie, être traitées par une transplantation de foie normal. Toutefois la transplantation du foie en entier présente de nombreux risques. En médecine humaine, des cas de guérison de l'hémophilie A suite à une transplantation hépatique ont été rapportés [125, 126]. Chez le Chien, une transplantation orthotopique partielle du foie (lobe gauche) a permis également une augmentation de la synthèse de facteur VIII à l'origine d'une guérison de l'hémophilie A [126]. Contrairement à la greffe totale, la greffe partielle permet de maintenir une fonction hépatique en cas de rejet de la greffe.

La transplantation hépatique pourrait donc être un moyen d'améliorer la qualité de vie des animaux hémophiles avec toutefois des réserves sur le risque de saignement pendant la chirurgie et sur un rejet éventuel du greffon.

d. Facteur VIIa recombiné :

Le facteur VIII est détruit rapidement dans le plasma sanguin ce qui n'est pas le cas pour le facteur VII, pour lequel il n'existe pas d'inhibiteur plasmatique connu [14]. L'utilisation de facteur VIIa humain recombiné (rh-VIIa) à une dose allant de 50 à 220 µg/kg, chez des chiens atteints d'hémophilie A a permis une normalisation des temps de coagulation dans l'étude de Brinkhous et collaborateurs, en 1989 [14]. Néanmoins une réaction immunologique contre le rh-VIIa s'est mis rapidement en place chez les chiens et le coût du traitement fut important [129].

e. Vitamine K et préparations pro-coagulantes :

Leur utilisation dans le cadre d'une hémophilie A ne présente aucun intérêt [55].

f. Utilisation des corticoïdes :

Dans les cas d'hématomes sous-cutanés et d'hémarthroses (une ponction articulaire est indiquée en cas d'épanchement important), l'usage de corticoïdes per os (triamcinolone) à fortes doses, 0,5 mg/kg en quatre prises à 6 heures d'intervalle pendant 5 à 8 jours a donné de bons résultats [91].

g. Danazole [80]

En 1983, Gralnick et Rick ont rapporté que l'apport de danazole, un dérivé d'androgène atténué, à des doses de 1,5 à 3 mg/kg augmentait de 100 à 500 % le taux de facteur VIII chez quatre patients humains atteints d'hémophilie A [87]. Néanmoins une autre étude de Garewal et collaborateurs, en 1985, n'a montré aucun effet sur la fréquence des saignements de cinq patients atteints d'hémophilie A. L'utilisation du danazole dans le cadre d'une hémophilie A semble donc décevante.

h. Desmopressine :

L'administration de desmopressine permet la libération, par les cellules endothéliales, de facteur de von Willebrand mais ne semble pas modifier la teneur plasmatique en facteur VIII chez le Chien alors que c'est le cas chez l'Homme. Son efficacité est donc discutable dans l'hémophilie A canine [44]. Olsen et collaborateurs, en 2003, ont montré que l'utilisation d'interleukine 11 humaine recombinée avec ou sans desmopressine permettait d'augmenter les quantités plasmatiques de facteur VIII chez certains chiens hémophiles A [176]. Reste encore à déterminer une éventuelle toxicité du traitement au long cours.

i. Molécules contre-indiquées :

L'utilisation de médicaments interférant avec l'hémostase est bien évidemment à proscrire. Ainsi on veillera à ne pas utiliser d'acide acétylsalicylique, de dérivés de la promazine, de sulfamides, de nitrofluranes ou de phénylbutazone [55, 137].

2. Prophylaxie :

a. Individuelle

Certaines règles sont à observer afin de limiter les saignements chez les animaux hémophiles. Ainsi il convient d'éviter les injections intramusculaires, de vermifuger systématiquement contre les trichures et les ankylostomes, de ne pas donner d'aliments traumatisants (os, ...), d'éviter l'utilisation de médicaments perturbant l'hémostase, de restreindre l'exercice pour limiter les traumatismes et pour la même raison ne pas laisser l'animal en liberté sans surveillance et enfin, avant tout acte chirurgical, procéder à un traitement prophylactique pour éviter les saignements durant l'opération (cryoprécipités).

Le moindre saignement est à traiter avec sérieux notamment par l'injection, dans l'idéal, de facteur VIII.

b. Programmes d'éradication

La mise en place d'un programme d'éradication d'une maladie héréditaire dans une race requiert certaines règles [131] :

- La maladie doit se produire dans une population définie avec une fréquence génétique suffisamment forte pour lui conférer une importance médicale ou économique,
- Les tests disponibles doivent être simples, relativement bon marché, capables d'identifier les hétérozygotes et présenter de fortes sensibilités et spécificités,
- Le contrôle par la diminution du nombre d'hétérozygotes, dans le cas d'une maladie récessive, ne doit pas avoir d'effets délétères sur les autres caractères génétiques de la population ou réduire de manière trop importante le nombre d'animaux de l'élevage jusqu'à un niveau désavantageux ou non économique,
- Les tests et les programmes de contrôle doivent être acceptés par les éleveurs et être précédés par des programmes de relation publique et d'éducation,
- Les logistiques du programme doivent satisfaire les éleveurs mais ne pas empiéter sur les autres programmes de prévention des maladies. Le programme devrait être intégré avec les autres schémas de contrôle d'autres maladies pour simplifier la récolte des échantillons,
- La participation des sociétés d'élevage et des clubs est capitale en instituant une législation quant à l'obligation de dépistage.

Ainsi un plan d'éradication a été proposé au Danemark pour l'hémophilie A chez le Berger Allemand. Il consiste à dépister les chiens malades et les femelles porteuses. Les mâles atteints sont

facilement détectables puisqu'ils présentent souvent des signes cliniques mais restait le problème des chiens vivant en milieu calme. Le problème concernait aussi la détection des femelles porteuses. Pour cela l'étude des pedigrees permet de détecter certaines femelles porteuses (filles de mâle atteint). Enfin une limite de 75 % de l'activité normale du facteur VIII a été choisie pour définir la limite en dessous de laquelle les femelles sont considérées comme porteuses [73]. Le programme défini a donc été le suivant :

- Tous les mâles suspects ont été soumis aux tests d'activité du facteur VIII,
- Toutes les femelles engendrées par un mâle atteint ont été écartées de la reproduction,
- Toutes les femelles suspectes (engendrant un mâle atteint) ont été retirées de la reproduction,
- Toutes les femelles ayant un pedigree suspect et une activité en facteur VIII inférieur à 75 % de la normale ont été retirées de la reproduction,
- Les femelles avec une activité en facteur VIII supérieure à 75 % de la normale pouvaient reproduire,
- Tous les mâles au pedigree évocateur et les femelles de pure race qui n'avaient pas été testées ont été disqualifiés comme reproducteur,

Sur 200 chiens, 50 mâles et 50 femelles ont été écartés de la reproduction sur plusieurs générations [73].

L'utilisation de femelles porteuses peut être envisagée dans les races à faible effectif à condition de ne les faire reproduire qu'avec des mâles dont le statut vis-à-vis de l'hémophilie A est connu comme normal. La progéniture devra alors être testée afin d'écartier de la reproduction les individus atteints (un mâle sur deux statistiquement) ou porteurs (une femelle sur deux statistiquement) [50]. Ce type de croisement a le désavantage de produire des individus atteints. En revanche, si l'on accouple un mâle atteint avec une femelle porteuse, toutes les femelles seront porteuses et donc à écartier de la reproduction, mais tous les mâles seront indemnes et donc utilisable pour perpétuer la lignée.

II. HÉMOPHILIE B

A. GÉNÉRALITÉS SUR L'HÉMOPHILIE B

1. Définition et épidémiologie

L'hémophilie B ou maladie de Christmas est une déficience héréditaire quantitative ou qualitative en facteur IX.

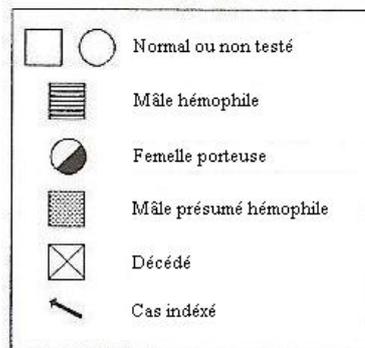
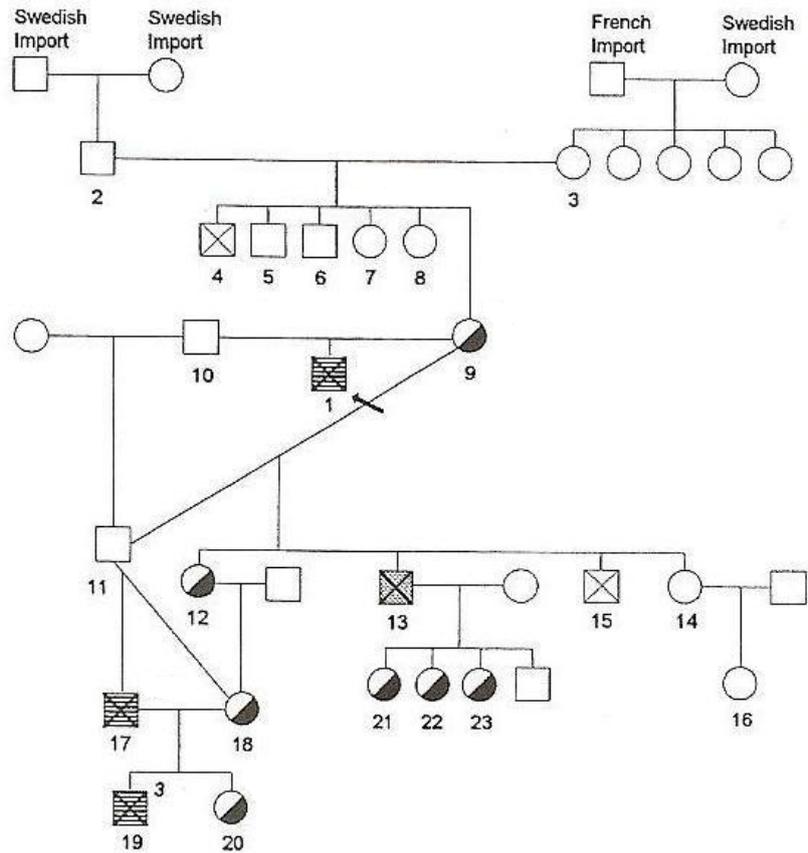
L'hémophilie B touche environ 1 homme sur 30 000 [86]. C'est la deuxième coagulopathie la plus décrite chez l'Homme et le Chien. A ce jour, elle est décrite dans les races canines suivantes : Airedale Terrier, Alaskan Malamute, Beagle, Berger allemand [71], Bichon Frisé, Bichon Maltais, Bouledogue Français, Braque Allemand, Braque de Weimar, Cairn Terrier, Chow-Chow, Cocker Anglais, Coonhound noir et feu, Drahtaar, Fox Terrier à poils durs, Jack Russel Terrier, Labrador Retriever, Lhasa Apso, Pinscher nain, Pit Bull Terrier, Rottweiller, Saint Bernard, Scottish Terrier, Sealyham Terrier, Shih Tzu [29, 217]. La maladie a aussi été rapportée dans certaines races de chats telles que : les British shorthairs, les Siamois (déficit combiné en facteur IX et XII), les chats domestiques à poils ras et les Himalayens (Persan *colourpoint*).

2. Mode de transmission

L'étude des pedigrees de familles de Bergers Allemands atteintes par l'hémophilie B a montré que seuls les mâles étaient atteints et qu'elle ne touchait pas toutes les générations. Ceci a permis de conclure à un mécanisme de transmission récessif lié au chromosome X [71]. Ainsi un père hémophile transmet le gène à toutes ses filles qui deviennent porteuses.

Chez l'Homme et le Chat, le mode de transmission est également récessif lié à l'X (Figure 33) [147].

Figure 33. Exemple de pedigree d'une famille de chats British shorthairs atteints d'hémophilie B d'après [147]



3. Etude des mutations intervenant dans l'hémophilie B

Le gène codant pour le facteur IX est présent, chez l'Homme, sur le chromosome X en Xq26-q27. Il occupe 33,5 kilobases et comporte 8 exons [29]. L'exon 1 code pour la séquence signal, l'exon 2 pour la région riche en acide γ -carboxyglutamique, l'exon 3 pour le faisceau de petits acides aromatiques, les exons 4 et 5 pour les domaines « *epidermal growth factor-like* », l'exon 6 pour le

peptide d'activation, l'exon 7 pour le domaine catalytique et l'exon 8 pour la région 3' non transcrite. Bien que cette structure ait été étudiée chez l'Homme, la séquence d'ADN_c du chien est comparable (86 % d'analogie au niveau des acides aminés d'après Evans et collaborateurs en 1989 [70]).

Evans et collaborateurs ont décrit, chez le chien, une mutation non-sens (G -> A au nucléotide 1477) qui conduit à une substitution d'un acide glutamique par un acide aminé glycine dans le domaine catalytique de la protéine [69]. Ce changement amène une modification de la conformation rendant le facteur IX inactif.

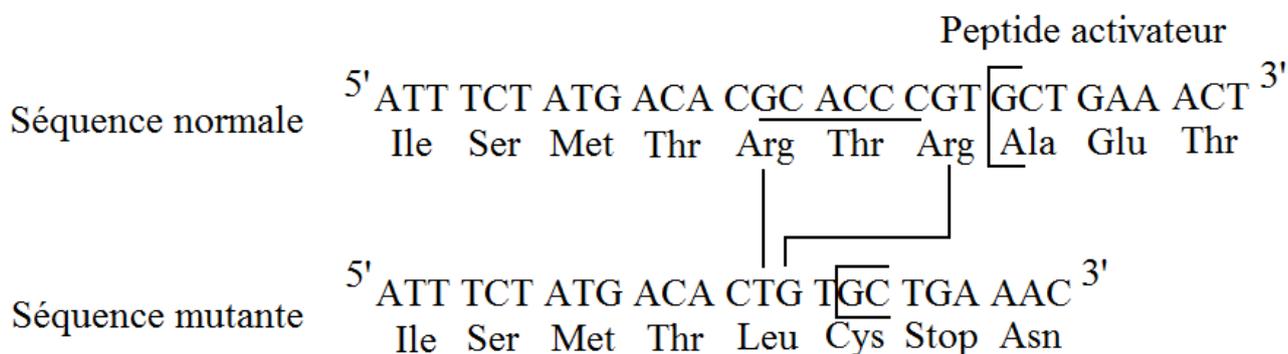
Mauser et collaborateurs ont rapporté chez des Lhasa Apso, une hémophilie B consécutive à une délétion des nucléotides 772 à 776 associée à une substitution de C -> T du nucléotide 777 (Figure 34) [143]. Ceci aboutit à la formation d'un ARNm instable et à la formation précoce d'un codon stop dans la région du peptide activateur. Un test génétique a donc pu être établi à partir de la découverte de cette mutation, pour les Lhasa Apso.

Brooks et collaborateurs, en 1997, ont montré chez un Labrador Retriever une délétion complète du gène codant pour le facteur IX responsable d'une hémophilie B sévère. Gu et collaborateurs, en 1999, ont décrits deux mutations causant des hémophilies B sévères : une large délétion allant de la région 5' du gène à l'exon 6 [89] et une insertion associé à un épissage alternatif de l'exon 8 amenant à la formation d'un codon stop [29].

Enfin une dernière mutation a été décrite par Brooks et collaborateurs, en 2003, dans une famille de Braque Allemand [28]. Les études de l'ADN par Southern Blot et PCR ont montré dans l'ADN des chiens hémophiles une insertion de 1,5 kilobases dans l'intron 5. Cette insertion consiste en un LINE-1 (*Long Interspersed Nuclear Element*) canin 5'. Cette mutation est responsable d'une hémophilie B moyenne (5 % d'activité par rapport à la normale).

Chez le Chat, Goree et collaborateurs ont décrit deux mutations différentes responsables d'hémophilie B chez des chats domestiques croisés [86]. Le premier chat hémophile étudié portait une mutation ponctuelle non sens dans l'exon 8 (Arginine -> STOP en position 338) conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée. Quant au second chat étudié, il portait une mutation ponctuelle faux-sens (Tyrosine -> Cystéine en position 82) qui détruisait un pont disulfure indispensable à la structure normale de la protéine [86].

Figure 34. Comparaison des séquences du gène codant pour le facteur IX et de la séquence en acides aminés du facteur IX d'un Lhasa Apso normal et d'un Lhasa Apso atteint d'hémophilie B



Légende : cette figure montre une comparaison entre la séquence du gène codant pour le facteur IX chez un Lhasa Apso normal (« *normal sequence* ») et d'une Lhasa Apso atteint d'hémophilie B (« *mutant sequence* ») où l'on constate un décalage du cadre de lecture chez le chien muté suite à une délétion de plusieurs bases.

B. SYMPTÔMES ET DIAGNOSTIC

1. Signes cliniques

Les signes cliniques de l'hémophilie B sont semblables à ceux présents chez les animaux atteints d'hémophilie A mais sont beaucoup plus modérés. En effet le facteur IX a un rôle moins important dans la coagulation. En général, il est considéré que les signes sont plus sévères chez les jeunes animaux ou chez les chiens de grande taille [167]. Ceci est sûrement dû au tempérament plus actif des jeunes et à l'environnement plus protecteur des petits chiens [40].

Chez le Chien, les manifestations cliniques les plus courantes sont les hématomes sous-cutanés ou intramusculaires consécutifs à des traumatismes notamment suite à des injections [167, 217]. Dans la littérature ont été rapportés des saignements prolongés suite à une coupe de queue, la coupe du

cordon ombilical, la perte des dents de lait ou un traumatisme quelconque ainsi que des douleurs d'origine indéterminée [80, 179, 190]. Des cas d'hémarthroses ont aussi été rapportés [196]. Les cas décrits d'hémophilie B chez le Chat ont montré des symptômes identiques avec une prédominance des boiteries dont la localisation variant avec le temps [25, 62, 147].

A la différence de l'hémophilie A, les animaux atteints d'hémophilie B semblent tous avoir un taux d'activité du facteur IX inférieur à 1 % de la normale. Un seul cas d'animal symptomatique ayant un taux égal à 80 % de la normale a été rapporté, il s'agissait d'un chien croisé mâle souffrant de saignements prolongés suite à des traumatismes mineurs [139].

2. Diagnostic

La méthode de diagnostic est identique à celle utilisée pour le diagnostic de l'hémophilie A. La principale anomalie mise en évidence est un allongement du temps de céphaline activée associé à un temps de Quick normal. La mesure de niveau d'activité des différents facteurs de la coagulation ne montre alors qu'une diminution de l'activité du facteur IX. L'activité du facteur IX peut être mesurée par mesure de la coagulation du plasma à tester en présence de plasma déficient en facteur IX. Des systèmes colorimétriques en cinétique fondés sur des mesures photométriques de temps de thromboplastine partiellement activée à partir de plasma déficient en facteur IX sont également utilisables pour déterminer l'activité du facteur IX chez un patient [74]. Ces tests nécessitent des animaux témoins.

L'étude de l'hémogramme ne montre généralement aucune anomalie sauf dans le cas de saignements très importants où une anémie est possible.

La découverte des mutations responsables de la maladie chez le Lhasa Apso et le Bull Terrier a permis le développement de tests génétiques pour ces deux races par trois laboratoires : Healthgene au Canada (www.healthgene.com), Progenus en Belgique (www.progenus.be) et VetGen aux Etats-Unis (www.vetgen.com). Les laboratoires Healthgene et Progenus ont également développé un test pour le Labrador Retriever. Enfin un test chez l'Airedale Terrier est possible dans le laboratoire Progenus.

C. TRAITEMENT

1. Médical

a. Transfusion

La transfusion de sang total ou de plasma est la thérapie d'urgence la plus facile à mettre en œuvre lors de saignements importants. Contrairement à l'hémophilie A, une transfusion toutes les 24 heures est suffisante dans le cas d'une hémophilie B car la demi-vie du facteur IX est d'environ 24 heures. Les règles à respecter sont identiques à celles décrites précédemment.

Il existe des fractions concentrées de facteur IX, titrant de 15 à 25 unités/mL, pouvant être administrées quotidiennement mais dont le coût et la disponibilité limitent l'utilisation en médecine vétérinaire [131].

La fraction PPSB est une substance extraite du plasma humain et contenant des concentrations élevées en proconvertine, prothrombine, facteur de Stuart et facteur IX. Son utilisation est intéressante dans le cas d'hémophilie B mais son utilisation en pratique est rarissime [131].

b. Facteur IX recombinant

L'ADN complémentaire du facteur IX humain a été cloné pour la première fois en 1982. L'expression du facteur IX par des cellules transfectées a été possible dès 1985 et a permis l'utilisation de facteur IX recombiné (rFIX) pour essayer de soigner l'hémophilie B. En 1996, Brinkhous et collaborateurs ont comparé les résultats obtenus chez des chiens hémophiles B après l'injection de rFIX et de facteur IX humain hautement purifié et ont montré que les effets procoagulants étaient identiques et que l'antigénicité de ces deux molécules était également identique [20]. Le facteur IX recombiné est donc un produit d'utilisation sûr et efficace dans la correction des troubles de la coagulation liés à l'hémophilie B canine et féline.

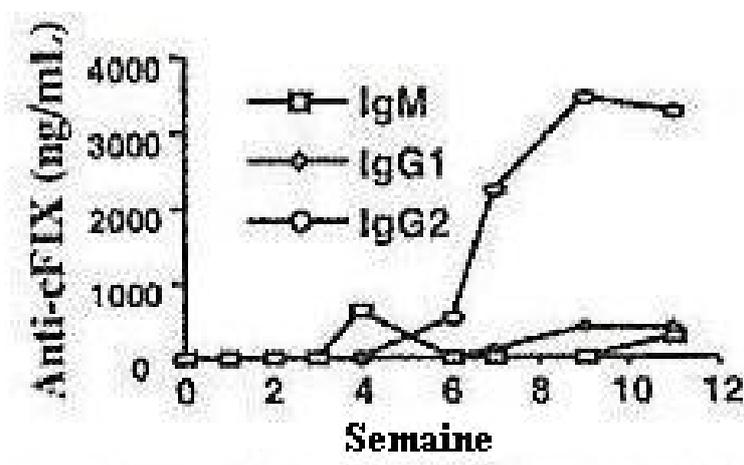
Une étude de Russell et collaborateurs, en 2003, a montré que des injections sous-cutanées de facteur IX recombiné en prophylaxie chez des chiens hémophiles B, avait réduit de 69 % la fréquence de saignements par rapport à des chiens non traités [191]. Toutefois les chiens traités étaient rendu immunologiquement tolérant au rFIX humain pour ne pas qu'il y ait de développement d'anticorps anti-rFIX.

c. Thérapie génique

L'utilisation d'adénovirus recombiné avec le facteur IX et capable de faire synthétiser le facteur IX par les hépatocytes [68, 120] ou les fibroblastes [167] permet aujourd'hui de traiter de manière efficace et sur le long terme des animaux atteints d'hémophilie B [3]. Les injections se font soit en intramusculaire [167] soit en intraveineux ; il a été montré chez des Rongeurs que le degré de transduction hépatique est directement lié à la dose d'adénovirus injecté. Des doses peu élevées permettent d'atteindre un seuil de 25 % d'activité du facteur IX considéré comme le seuil curatif [120].

Le problème reste le développement de certains anticorps anti-facteur IX au bout de quelques semaines [164] (Figure 35).

Figure 35. Taux d'IgM, d'IgG1 et d'IgG3 chez un chien suite à l'administration d'un adénovirus recombiné [164]



Légende : le graphe montre la variation des taux d'immunoglobulines M (IgM) et G (IgG1 et IgG2) (mesuré par la quantité d'anticorps anti-facteur IX) en fonction du temps suite à l'administration d'un adénovirus recombiné.

Aucune toxicité hépatique ou thrombocytopenie n'a été rapportée avec cette méthode [33, 68]. Une réaction fébrile transitoire liée probablement à une coagulation intravasculaire disséminée moyenne semblait apparaître lors de l'injection de doses d'adénovirus recombiné plus importante [120].

Tatsumi et collaborateurs ont montré, en 2008, que la transplantation de cellules hépatiques humaines ou canines chez des souris immunodéficientes permet la propagation de ces cellules ainsi que la production de facteur IX [206]. Harding et collaborateurs, en 2004, ont démontré pour la

première fois que le vecteur AAV-2 (virus adénoassocié de type 2) permettait une correction partielle de l'hémophilie B chez le chien [97].

Enfin Fewell et collaborateurs ont décrit en 2001, la possibilité de transférer un plasmide au niveau des cellules musculaires par une injection directe dans le muscle, associée à la mise en place d'un champ électrique. L'utilisation de cette méthode pour le transfert d'un plasmide contenant le gène codant pour le facteur IX humain et protégé par un polymère protecteur, interactif et non condensé (PINC) a permis l'expression d'un taux de facteur IX humain égal à 0,5 à 1 % du taux normal chez un chien atteint d'hémophilie B [72]. Toutefois la formation d'anticorps anti-facteur IX humain a limité l'effet dans le temps du facteur IX.

d. Danazole

Gralnick et collaborateurs, en 1983, ont également rapporté une augmentation de l'ordre de 280 % du taux de facteur IX chez des patients hémophiles B suite à l'apport de danazole [87]. En 1986, une étude de Brinkhous et collaborateurs, chez une famille de chats croisés siamois atteints d'hémophilie B (combinée à une déficience en facteur XII), a montré que l'apport de 5 mg/kg par voie orale une fois par jour pendant 7 à 9 jours ne modifiait pas le temps de coagulation des chats malades et que l'activité du facteur IX ne présentait aucune augmentation [12, 14]. L'utilisation du danazole comme traitement de l'hémophilie a donc été abandonnée.

e. Facteur VIIa recombiné

Comme pour l'hémophilie A, l'utilisation de facteur VIIa humain recombiné donne d'excellents résultats dans le traitement de l'hémophilie même si les réactions immunitaires et le coût en limite l'utilisation en médecine vétérinaire [131].

2. Prophylaxie

Les règles à suivre pour la prophylaxie individuelle et pour l'éradication de la maladie sont les mêmes que pour l'hémophilie A puisque la symptomatologie et le mode de transmission sont identiques.

III. DÉFICITS D'ORIGINE GÉNÉTIQUE DES AUTRES FACTEURS DE COAGULATION

A. DEFICIT HEREDITAIRE EN FIBRINOGENE

1. Définition et mode de transmission

Les désordres héréditaires touchant le fibrinogène sont de deux types : le type I correspond à un déficit quantitatif en fibrinogène (afibrinogénémie) avec des taux sanguins en fibrinogène non mesurable alors que le type II correspond à un déficit qualitatif du facteur I (dysfibrinogénémie et hypodysfibrinogénémie) où le taux est normal alors que l'activité coagulante est réduite [4].

Chez l'Homme, la maladie a été décrite pour la première fois en 1920. On sait aujourd'hui que la maladie de type I est une maladie rare de transmission autosomique récessive alors que la maladie de type II est généralement de transmission autosomique dominante [4]. Plus de 40 altérations génétiques différentes ont été mises en évidence chez l'Homme [66, 221] ; la consanguinité était fréquente dans les familles atteintes étudiées. L'étude génétique des mutations ne permet pas à l'heure actuelle de corréler les altérations génétiques au phénotype de l'individu atteint [4].

Une hypofibrinogénémie héréditaire a été décrite chez le chien mais l'afibrinogénémie n'a pour l'heure été décrite que chez la Chèvre [74]. Fogh et collaborateurs ont rapporté que des cas avaient été décrits chez une famille de Saint Bernard, chez le Colley et chez le Barzoï ; un cas d'afibrinogénémie primaire a été décrit chez un Bichon frisé mais la transmission de la maladie n'a pas été étudiée [74, 223]. Le mode de transmission de la maladie n'est pas clair chez le Chien, il peut être soit autosomique dominant soit autosomique récessif [74].

2. Symptômes [74]

Les animaux atteints présentaient des diathèses hémorragiques sévères pouvant conduire à la mort. En plus des symptômes hémorragiques, des maladies aiguës ou chroniques du foie ainsi qu'une coagulation intravasculaire pouvaient survenir chez les chiens atteints.

Les manifestations chez l'Homme sont parfois catastrophiques. Ainsi ont été rapportés des cas de mortalité néonatale par hémorragies massives suite à la rupture du cordon ombilical. Les signes cliniques sont des hémorragies au niveau des muqueuses (épistaxis, ménorrhées importantes, saignements gastro-intestinaux), des hémorragies musculaires ou articulaires, des avortements spontanés ou encore des ruptures spontanées de la rate. Des hémorragies intracrâniennes constituent enfin une cause de mortalité possible.

Une association de l'afibrinogénémie avec une déficience en protéine C est possible et peut compliquer les manifestations décrites ci-dessus [223].

3. Diagnostic

L'étude des temps de coagulation a montré un allongement des temps fondés sur la formation d'un clou plaquettaire. La mesure du taux de fibrinogène sanguin montrait alors une baisse importante [74].

La plupart des méthodes de dosage du fibrinogène reposent sur l'hypothèse que la thrombine transforme quantitativement le fibrinogène en fibrine. La concentration estimée à partir du poids ou du contenu protéique du caillot de fibrine peut être soumise à des erreurs importantes dues à la présence d'inhibiteurs qui bloquent partiellement ou totalement la formation du caillot. La plasmine peut être aussi à l'origine d'une lyse importante du caillot formé avant que le dosage du fibrinogène ne soit achevé. D'autres méthodes fondées sur la précipitation par le sulfate d'ammonium ont été décrites mais elles ne sont pas corrélées avec le temps de thrombine lorsque le fibrinogène est inférieur à 1 g/L. La détermination de l'activité biologique (coagulabilité) est plus utile au diagnostic que le dosage pondéral du fibrinogène circulant. La méthode de Clauss mesure la vitesse de conversion du fibrinogène en fibrine en présence d'un excès de thrombine. Elle est rapide, sensible et précise. La méthode décrite ci-dessous applique le principe de Clauss. Lorsque le plasma dilué coagule en présence d'un excès de thrombine, la concentration en fibrinogène est inversement proportionnelle au temps de coagulation obtenu ; la représentation graphique sur papier bilogarithmique fait apparaître une relation curvilinéaire. La concentration de fibrinogène du plasma testé est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage établie à l'aide d'un fibrinogène de référence. Enfin la réalisation de thromboélastogramme permet d'évaluer la qualité du clou plaquettaire [76].

4. Traitement

L'utilisation de transfusions de sang total ou de plasma est la méthode la plus souvent utilisée en traitement d'urgences mais la formation d'anticorps peut alors survenir [223]. Il existe aujourd'hui des concentrés de fibrinogène plus efficaces pour le traitement de cette maladie. Il est toutefois

nécessaire de faire attention lors de l'utilisation des concentrés car des thromboses paradoxales lors d'apport massif de facteur I peuvent apparaître.

L'utilisation des cryoprécipités par l'apport de fibrinogène qu'elle permet est également intéressante [223].

B. DÉFICIENCE HÉRÉDITAIRE EN PROTHROMBINE

1. Définition et mode de transmission

La déficience héréditaire en prothrombine est une maladie rare chez l'Homme (1 cas sur 200 000 personnes [108] qui s'exprime soit par une hypoprothrombinémie (la protéine exprimée est fonctionnelle mais en trop petite quantité) soit par une dysprothrombinémie (la protéine synthétisée n'est pas fonctionnelle). Des cas d'hypoprothrombinémie ont été décrits chez moins de 20 familles et les mutations responsables ne sont pas toujours connues. Quant à la dysprothrombinémie, 25 formes de variants non fonctionnels ont été rapportés dans la littérature [173].

Chez le Chien, une dysprothrombinémie héréditaire a été décrite dans une famille de Boxer, chez laquelle l'activité de la prothrombine était réduite malgré un antigène normal [74]. Une étude de Hill en 1982 a rapporté un cas de déficience en prothrombine chez une chienne Cocker mais aucune étude du pedigree n'a été réalisée et le caractère héréditaire n'a pu être déterminé [103]. Une hypoprothrombinémie peut être induite par une déficience en vitamine K, des poisons comme la warfarine ou le dicumarol ou des maladies hépatiques. Il est intéressant de noter que tous les mammifères nouveaux-nés présentent une hypoprothrombinémie physiologique [74].

Chez l'Homme, comme chez le Chien, la transmission est autosomique récessive [74, 108].

2. Symptômes

Les premières manifestations, chez l'enfant, sont des saignements importants lors de la coupe du cordon ombilical et des épistaxis. Chez l'adulte, comme chez le Chien, les signes cliniques sont

moins importants : saignements au niveau des muqueuses et formation d'hématomes suite à des traumatismes [74, 103].

3. Diagnostic

Le temps de prothrombine et le temps de thromboplastine partiellement activée sont allongés dans le cas d'une déficience en prothrombine. Ses résultats sont associés à une diminution de l'activité du facteur II et lors d'hypoprothrombinémie à une diminution de l'antigène facteur II (FII:Ag). La détermination de l'activité de la prothrombine se fait soit par une méthode ELCA (*Enzym-linked coagulation assay*) à partir de plasma monodéficient en prothrombine et de hautes concentrations d'extrait de cerveau soit par une méthode colorimétrique en cinétique fondée sur le temps de prothrombine dans laquelle le plasma est activé par de la thromboplastine humaine et du calcium en présence d'un substrat chromogène [74]. Les résultats de ces méthodes sont comparés entre animal sain et animal atteint.

4. Traitement

Le seul traitement spécifique est l'apport de concentrés de prothrombine mais la plupart du temps en pratique une transfusion de sang total ou de plasma sera réalisée [103].

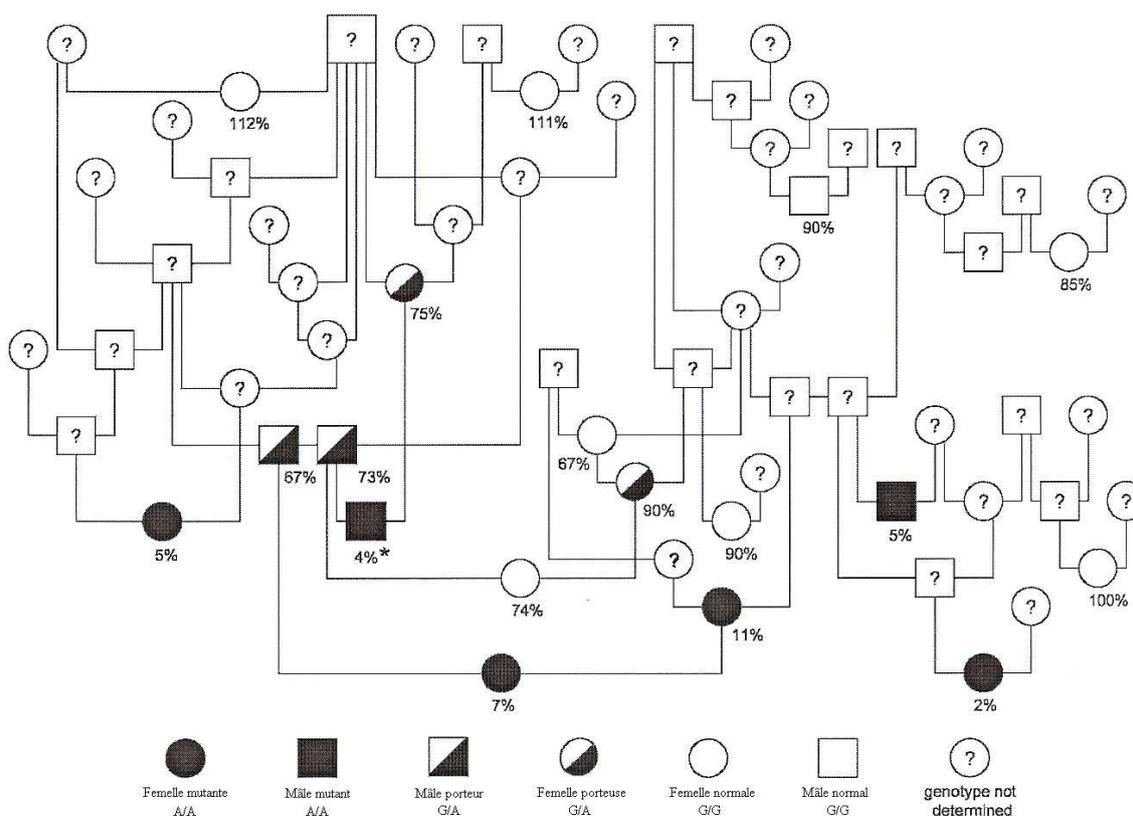
C. DÉFICIT EN FACTEUR VII

1. Définition et mode de transmission

Une déficience héréditaire en facteur VII ou hypoproconvertinémie a été décrite pour la première fois chez le Chien en 1962 chez un Beagle [58]. Depuis, elle a été identifiée chez plusieurs Beagles aux Etats-Unis et au Royaume Uni dans des centres de recherche ou chez des particuliers [58]. L'anomalie a également été rapportée chez un chiot Alaskan Malamute [159], un chien croisé [145] ainsi que chez un Alaskan Klee Kai [119].

La transmission se fait, chez l'Homme et chez le Chien, selon un mode autosomique récessif (Figure 36) ; les hétérozygotes sont asymptotiques et les homozygotes présentent rarement des signes cliniques [34].

Figure 36. Pedigree d'une famille d'Alaskan klee kai atteinte de déficience en facteur VII [119]



Légende : les chiffres notés sous les symboles correspondent aux valeurs de l'activité du facteur VII (en %).

Une étude de Callan et collaborateurs a permis de caractériser le défaut génétique à l'origine de l'hypoproconvertinémie dans une famille de Beagle [34]. La comparaison des séquences d'ADN des animaux sains et des animaux atteints a permis la mise en évidence d'une substitution d'une

base guanidine en adénosine au niveau de l'exon 5 à l'origine de la substitution de l'acide aminé glycine 96 en acide glutamique au niveau du domaine « *epidermal growth factor-like* ». Cette mutation a également été identifiée chez l'Alaskan Klee Kai [119].

2. Symptômes

Le facteur VII est un facteur direct d'activation du facteur X par la voie extrinsèque qui est probablement, chez le Chien, beaucoup moins importante que la voie intrinsèque pour la formation de prothrombinase, ce qui explique pourquoi la déficience en facteur VII est dépourvue de signes cliniques la plupart du temps [183, 201]. Par contre, chez l'Homme, les malades présentent des diathèses hémorragiques parfois très sévères. Ainsi les signes cliniques associés dans les divers cas incluent des épistaxis spontanés, des hématomes sous-cutanés, des saignements gastro-intestinaux et génito-urinaires, des hémothorax [58] ou des hémarthroses (sans boiterie) [130]. C'est pourquoi la maladie a été étudiée chez le Chien comme modèle de l'hypoproconvertinémie congénitale humaine.

En effet, chez le Chien, la plupart des cas de déficience en facteur VII sont découverts de manière fortuite soit lors d'étude [181, 200] soit lors de bilan préchirurgical. Toutefois ont été rapportés : des saignements persistants utérins et vaginaux chez une femelle Beagle [201, 221], une tendance à la formation d'hématomes chez un Alaskan Malamute [159] ou des saignements persistants post-chirurgicaux (orchidectomie) chez un chien croisé [145] ou post-traumatiques chez un Alaskan Kee Kai [119].

Les malades semblaient prédisposés aux démodécies systémiques, les défauts extrinsèques de la coagulation fournissant un environnement idéal au développement des parasites [74]. Fogh a rapporté également un cas de déficience en facteur VII acquise suite à une maladie hépatique et une déficience en vitamine K [74].

3. Diagnostic

Chez les chiens atteints, le temps de prothrombine était prolongé mais le test de Russell au venin de vipère était normal. La mesure de l'activité du facteur VII a montré une baisse chez les chiens atteints : 1 à 5 % par rapport à la normale pour les homozygotes et 35 à 65 % chez les hétérozygotes. Les femelles gestantes présentaient une augmentation de la concentration en facteur VII [].

Le dosage du facteur VII s'effectue soit par une méthode électro-immunologique utilisant la précipitation du facteur en présence d'un anticorps anti-facteur VII marquée à l'iode 125 soit par une méthode colorimétrique de coagulation liée à une enzyme (ELCA : *Enzym-linked coagulation assay*) où le plasma du chien à tester est mis en présence d'un plasma déficient en facteur VII et utilisant le facteur III comme activateur [74]. Ces deux tests nécessitent des comparaisons avec des plasmas de chiens normaux.

Les laboratoires américains PennGen (<http://research.vet.upenn.edu/penngen>) et VetGen (www.vetgen.com) disposent aujourd'hui de test génétique pour cette maladie pour l'Alaskan Klee Kai, le Beagle et le Lévrier Ecossais. Le laboratoire VetGen propose en plus des tests génétiques pour l'Airedale Terrier et le Schnauzer géant.

4. Traitement

Le traitement des saignements incluent des contrôles locaux (compression, sutures, cauthérisation) mais l'administration de plasma frais ou surnageant de cryoprécipités peut parfois être nécessaire. La demi-vie du facteur VII étant courte (4 à 6 heures), des transfusions répétées sont souvent requises pour arrêter les hémorragies.

En médecine humaine sont utilisés aujourd'hui des recombinants activés du facteur VII (rFVIIa) à une dose de 20 µg/kg mais la demi-vie du rFVIIa n'est que de 3 heures par conséquent des administrations répétées sont nécessaires toutes les 4 à 6 heures. L'administration de dose allant de 5 à 30 µg/kg chez des Beagles a permis une normalisation du temps de prothrombine [226]. Le coût reste pour le moment très important (1 300 \$ pour 1 à 2 mg) pour remplacer les transfusions de plasma en médecine vétérinaire [119].

D. DÉFICIT EN FACTEUR X

1. Définition et mode de transmission

La déficience congénitale en facteur X a été décrite chez l'Homme pour la première fois en 1956 mais c'est une maladie qui reste très rare (décrite dans une cinquantaine de familles) [63]. Chez le Chien, elle est décrite chez le Cocker Américain [63] et le Jack Russell Terrier [54] ; quant aux chats le premier cas décrit date de 1997 [85].

Les études réalisées sur les pedigrees des chiens atteints a montré un mode de transmission autosomique dominant à pénétrance incomplète contrairement à ce qui se passe chez l'Homme ou chez le Chat où la transmission est de type autosomique récessive [54]. Chez l'Homme, le gène a été localisé sur le chromosome 13 en position 13q34 et contient 9 exons ; de nombreuses mutations ont été mises en évidence pour expliquer la diminution d'activité du facteur X. Le déficit d'activité en facteur X semble s'expliquer plutôt par une dysfonction de ce facteur que par une déficience [54].

2. Symptômes

Des saignements modérés à excessifs ont été rapportés lors de diverses interventions chirurgicales (coupe de queue, ovariohystérectomie). Des saignements ont également été rapportés chez le chiot lors de l'éruption des dents définitives ; d'autre part la période de néonatalité apparaît être une période à risque avec un taux de mortalité important. Les manifestations cliniques chez le Chien comprennent d'une part des saignements fréquents et d'autre part des conséquences des saignements : distension abdominale, ecchymoses, anémie [54]. Chez le Chat, ce sont des convulsions qui ont été le signal d'appel celles-ci ayant été a posteriori mises en relation avec des hémorragies intracrâniennes ; toutefois aucun autre cas clinique n'a été rapporté ce qui ne permet pas de conclure quant à l'importance de ce signe clinique dans le déficit en facteur X, même si, chez l'Homme, sont décrites également des hémorragies intracrâniennes chez des enfants atteints de ce déficit. D'autre part, le chat étudié n'a pas présenté de saignements importants lors de la castration mais des hématomes supra-orbitaires bilatéraux et des pétéchies au niveau de la muqueuse buccale ont été rapportées [85].

3. Diagnostic

Le facteur X intervenant dans la voie commune de la coagulation, son déficit affecte les voies intrinsèques et extrinsèques de la coagulation, ce qui se traduit par une augmentation des temps de céphaline activée et de Quick. La mesure de l'activité du facteur X montre une baisse de cette activité (3 à 13 % dans l'étude de Cook et collaborateurs, en 1993, et inférieure à 2 % chez le chat atteint de ce déficit [54]). Des déficits acquis isolés du facteur X ont été décrits chez l'Homme dans des cas d'amyloïdose systémique, d'infection (notamment de l'appareil respiratoire), de néoplasie (carcinome rénal) ou lors de l'administration de certains médicaments, mais cela n'a jamais été décrit chez les carnivores domestiques [54, 85].

4. Traitement

Le traitement des saignements prolongés consiste à transfuser l'animal selon les règles vues précédemment. L'ajout de vitamine K ne permet pas de traiter le déficit et ne présente donc pas d'intérêt [54].

E. DÉFICIT EN FACTEUR XI

1. Définition et mode de transmission

Le déficit en facteur XI a été décrit chez l'Homme pour la première fois en 1953 par Rosenthal chez un homme et ses deux nièces présentant des saignements importants lors d'extraction dentaire [77]. Le déficit en facteur XI a alors été appelé hémophilie C. La maladie est à transmission autosomique récessive et est de fréquence rare (1 cas sur 1 000 000 d'après Fujikawa [77]) mais dans certaines ethnies comme les juifs Ashkenazi elle peut atteindre 12 %. De nombreuses mutations (plus d'une centaine d'après Fujikawa [77]) ont été décrites à ce jour [236]. Pour la majorité des patients atteints de déficience en facteur XI, la baisse d'activité du facteur XI est due à une baisse de la concentration de la protéine plutôt qu'à une protéine dysfonctionnelle (seulement trois cas décrits dans la littérature [209]). Les patients hétérozygotes ont généralement des déficits partiels (25 à 50 % d'activité par rapport à la normale [74]) et sont asymptomatiques.

Chez le Chien, la première description a été faite en 1971 par Dodds dans une famille de Springers spaniels [183]. Depuis la déficience a été rapporté chez le Kerry Blue Terrier [124, 207] et le

Montagne des Pyrénées [189]. Le mode de transmission semble être autosomique récessif chez le Kerry Blue Terrier [124].

La maladie est également présente chez le Chat [209] et chez les bovins [161]. Par contre la déficience en facteur XI est physiologique chez la tortue, la poule et le canard [74].

La mutation causale a été identifiée chez le Kerry Blue Terrier. Il s'agit de l'insertion d'un élément SINE (*Short Interspered Nuclear Element*) dans l'exon 7 du gène codant pour le facteur XI [207].

2. Symptômes

Chez l'Homme, la déficience en facteur XI n'induit que rarement des hémorragies spontanées mais plutôt des saignements importants suite à une chirurgie ou un traumatisme. Les diathèses hémorragiques peuvent être bénines comme très sévères et se caractérisent par des épistaxis, des ménorragies, des saignements prolongés suite à des extractions dentaires ou tout autre opération chirurgicale.

Chez le Chien ont été rapportés des épistaxis, des hématuries et des formations spontanées d'hématomes (qui se résolvent spontanément). Le premier cas rapporté, chez une femelle Springer Spaniel, l'a été suite à des saignements majeurs suite à une ovariohystérectomie [124].

Troxel et collaborateurs, en 2002, ont décrit chez une chatte de 6 mois des saignements majeurs suite à la stérilisation (hématome en regard de la plaie) et à l'exercice des griffes. Ce même animal a présenté un hématome important sur une patte suite à un saut [209].

3. Diagnostic

La mesure des temps de coagulation montre un allongement du temps de thromboplastine partiellement activée associé à un temps de prothrombine normal indiquant un trouble de la voie intrinsèque de la coagulation. La mesure de l'activité du facteur XI chez le Chien montre alors des valeurs inférieures à 10 % chez les homozygotes et comprises entre 25 et 50 % chez les hétérozygotes [74]. La mesure de l'activité se fait par une méthode dérivée du temps de thromboplastine partiellement activée (système colorimétrique en cinétique) à l'aide de plasma bovin déficient en facteur XI [74].

Le laboratoire américain PennGen (<http://research.vet.upenn.edu/penngen>) dispose aujourd'hui d'un test génétique pour le déficit en facteur XI dans la race Kerry Blue Terrier.

4. Traitement

La transfusion de plasma frais ou réfrigéré reste la méthode de choix pour contrôler les hémorragies. Même si Knowler et collaborateurs, en 1994, ont montré que 3 mois après la transfusion, chez le Chien, aucun anticorps inhibant le facteur XI n'était présent, ce phénomène est largement décrit chez l'Homme [124, 208]. La longue demi-vie du facteur XI (30 à 84 heures) permet d'espacer les transfusions [124]. Enfin le surnageant de cryoprécipités peut être utilisé pour créer des concentrés de facteur XI qui pourront alors remplacer les transfusions de plasma [124].

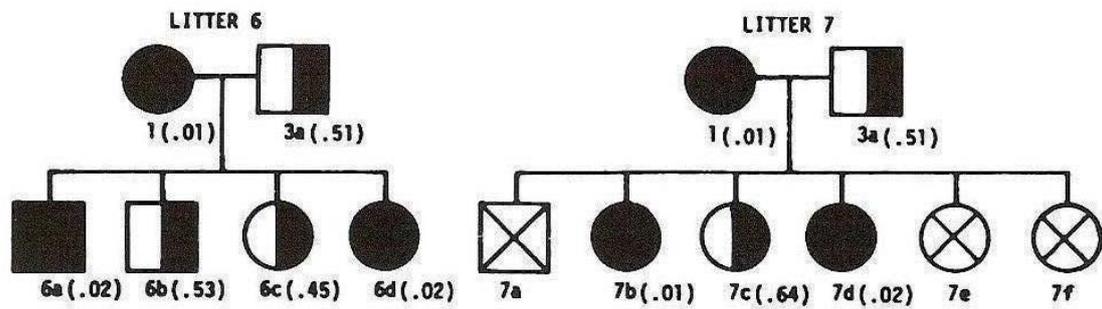
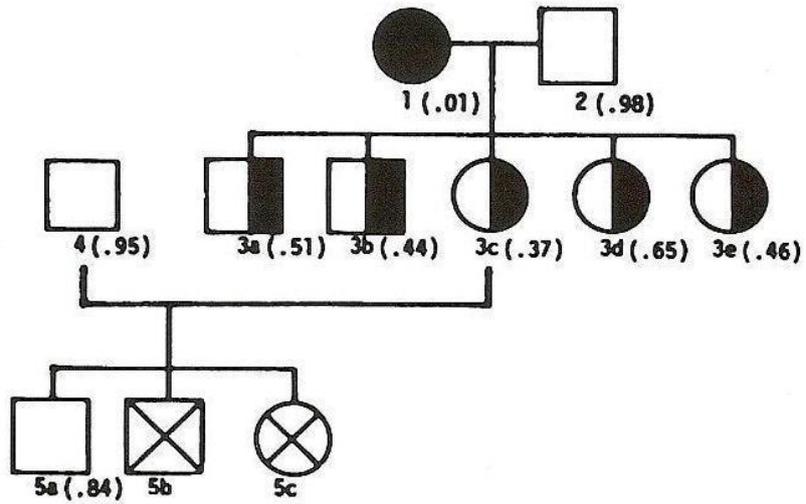
F. DÉFICIT EN FACTEUR XII

1. Définition et mode de transmission

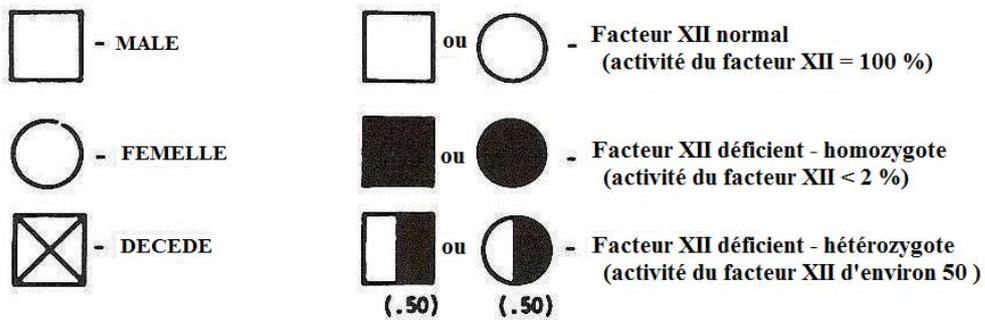
Le déficit congénital en facteur XII ou d'Hageman a été décrit pour la première fois chez l'Homme en 1955 [88]. La première description de ce déficit chez le Chat date de 1959 mais la caractérisation par des études de laboratoire est arrivée 20 ans plus tard chez un chat domestique [88]. Des cas ont depuis été rapportés chez des chats domestiques et des chats croisés siamois en Angleterre et aux Etats-Unis [62, 138]. Il s'agit du trouble héréditaire de la coagulation plasmatique le plus fréquent chez les chats domestiques avec l'hémophilie A [21]. Une étude retrospective réalisée aux Etats-Unis entre 1998 et 2004 a montré un ratio entre les cas de déficit en facteur XII et l'hémophilie A et B respectivement de 2:1 et de 4:1 [22].

Le déficit en facteur XII est, le plus souvent, de transmission autosomique récessive (Figure 37) [22]. Ainsi les porteurs hétérozygotes ont une activité du facteur de Hageman comprise entre 20 et 50 % alors que les homozygotes ont une activité inférieure à 1 %. Seul 10 % des malades présente une protéine détectable immunologiquement indiquant que le déficit en facteur XII est un déficit quantitatif [22].

Figure 37. Pedigree d'une famille de chat déficient en facteur XII [122]



LEGENDE



L'étude du pedigree présentée en figure 37 a montré qu'aussi bien les mâles que les femelles étaient touchés ce qui montre que la transmission est autosomique. D'autre part, lorsqu'un des parents présentaient un déficit majeur dans l'activité en facteur XII, les enfants présentaient un déficit moyen. Ainsi on a pu également conclure que, comme chez l'Homme, l'allèle anormal était récessif [170].

Le gène humain codant pour le facteur XII a été localisé que le chromosome 5 en position 5q35. Les analyses moléculaires du gène pratiquées chez les malades ont montré que dans la plupart des cas les mutations incriminées correspondaient à des changements de base ponctuels qui induisent la synthèse de protéines anormales [100].

2. Symptômes :

La découverte d'un déficit en facteur XII est dans la plupart des cas fortuite suite à un bilan sanguin de routine. En effet, bien que le déficit provoque des altérations marquées sur les tests *in vivo*, les chats atteints ne présentent ni saignements spontanés ni saignements excessifs suite à un traumatisme ou une chirurgie. Les différences entre la génération physiologique de la fibrine et les réactions *in vitro* de la voie intrinsèque expliquent ce paradoxe [22]. Il semblerait que l'absence de troubles cliniques soit due au rôle de la thrombine dans l'activation du facteur XI ; en effet la petite partie de thrombine activée par la voie extrinsèque suffirait à compenser le déficit en facteur XII [100]. Le déficit en facteur XII se distingue donc des autres déficits héréditaires par son absence d'expression clinique.

Le tableau 15 montre que, contrairement à l'hémophilie A ou B, la découverte de ce déficit se fait aussi bien chez les mâles et les femelles et est en moyenne de découverte beaucoup plus tardive, ceci à cause de l'absence de manifestation clinique. Les races les plus touchées sont principalement les chats domestiques (près de 75 %) mais la race Siamoise semble particulièrement sensible également [100].

En raison des effets du facteur XII sur les réactions inflammatoires et immunitaires, il apparaît qu'avant l'âge de 4 mois, les chatons atteints du déficit en facteur XII sont plus sujets aux infections bactériennes que les chatons indemnes [123].

Tableau 15. Signalement de 51 chats présentant des déficiences héréditaires en facteur de la coagulation [22]

Déficit	Nombre de chats	Sexe	Age (années) lors du diagnostic	Races touchées
Facteur XII	30	18 femelles 12 mâles	3 (0,5-16)	20 CDC* 2 CDL* 6 Siamois 1 Himalayen 1 race inconnue
Hémophilie A	13	13 mâles	0,75 (0,3-10)	11 CDC* 1 Birman 1 race inconnue
Hémophilie B	8	8 mâles	0,5 (0,5-3)	5 CDC* 1 CDL* 1 Persan 1 Himalayen

Légende : CDC = Chat Domestique à poils Courts ; CDL = Chat Domestique à poils Longs.

3. Diagnostic :

Le diagnostic de ce déficit se fait tout d'abord par la mise en évidence d'un allongement du temps de céphaline activée accompagnée d'une mesure de temps de prothrombine normale. Ces résultats sont caractéristiques d'un déficit de la voie intrinsèque de la coagulation. Une diminution de l'activité du facteur XII permet alors de caractériser la déficience en facteur d'Hageman (activité

inférieure à 2 % de l'activité normale) si aucun inhibiteur du facteur XII n'est mise en évidence. Pour cela un mélange 1:1 entre le plasma du patient et le plasma d'un animal sain doit amener à une normalisation des temps de coagulation ; c'est la seule méthode permettant un diagnostic définitif de déficit. Pour mesurer ce déficit, Kier et collaborateurs ont utilisé une méthode dérivée de la procédure de Rapaport en utilisant un plasma humain déficient en facteur XII à la place d'un plasma humain déficient en facteur XI. Pour réaliser une courbe de calibration, ont été utilisés les plasmas de cinq chats normaux dilués au 1:10, au 1:50, au 1:100 et au 1:200 à l'aide d'une solution saline phosphatée tamponnée. Ensuite 0,1 mL de la solution ont été ajoutés à 0,1 mL de plasma humain déficient en facteur XII avant que le mélange soit incubé pendant 6 minutes avec 0,1 mL de céphaline-kaolin. La mesure du temps de coagulation a démarré après l'ajout simultané de 0,1 mL de MgCl_2 et d'une sonde de fibromètre de volume égal à $0,4 \text{ cm}^3$. La mesure s'arrête quand le fibromètre détecte la formation de fibrine. La dilution du plasma de Chat normal au 1:10 est utilisée pour déterminer l'activité de 100 % [123].

Attention toutefois au cas de multiples déficits en divers facteurs, la présence d'un déficit en facteur XII seul ne permettant pas d'expliquer la présence de saignements prolongés.

4. Traitement

Les chats déficients en facteur XII ne nécessitent pas de traitement particulier tel qu'une transfusion suite à une chirurgie ou un traumatisme, l'hémostase se réalisant normalement. Brooks et collaborateurs ont rapporté 9 cas de chats stérilisés qui n'ont présenté aucun trouble durant la chirurgie malgré leur déficit [22].

G. DÉFICIENCE EN PRÉKALLIKRÉINE

1. Définition et mode de transmission

La déficience en prékallikréine ou facteur de Fletcher a été décrite pour la première fois chez l'Homme par Hataway en 1965. C'est un désordre héréditaire extrêmement rare de transmission autosomique récessive [1].

Chinn et collaborateurs rapportent en 1986 un cas de déficience en prékallikréine chez un Caniche de 14 ans [47].

2. Symptômes

En absence de facteur Fletcher, le facteur XII est activé plus lentement (environ 100 fois moins vite que normalement [47]). Ainsi la plupart des patients atteints d'une déficience ne présentent aucune manifestation clinique de la maladie. Des thromboembolies ont néanmoins été rapportées chez certaines personnes [1].

Dans le cas décrit dans l'espèce canine, la chienne présentait une hématurie chronique [47]. A la vue des examens pratiqués, seule une déficience en prékallikréine semblait expliquer les symptômes. L'étude n'a pas permis de conclure sur l'origine héréditaire ou congénitale de la maladie de cet animal.

3. Diagnostic

Les patients atteints présentent un temps de saignement normal, un temps de prothrombine normal mais un prolongement important du temps de thromboplastine partiellement activée. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour une déficience en facteur XII. Hors une mesure directe de l'activité de la prékallikréine ou un dosage de l'antigène n'est pas faisable à l'heure actuelle en routine ; une déficience en prékallikréine est donc à considérer chez tous les patients asymptomatiques présentant un allongement du temps de thromboplastine partiellement activée avec une activité du facteur XII dans les normes usuelles. L'incubation à 37°C du plasma du patient atteint mélangée au plasma d'un patient sain avec un rapport 1:1 normalise les temps de coagulation [1].

4. Traitement

Aucun traitement n'est nécessaire même en prévention avant une chirurgie à la vue des symptômes mineurs causés par la maladie.

H. COAGULOPATHIE CONGÉNITALE DÉPENDANTE DE LA VITAMINE K

1. Définition et mode de transmission

a. Définition

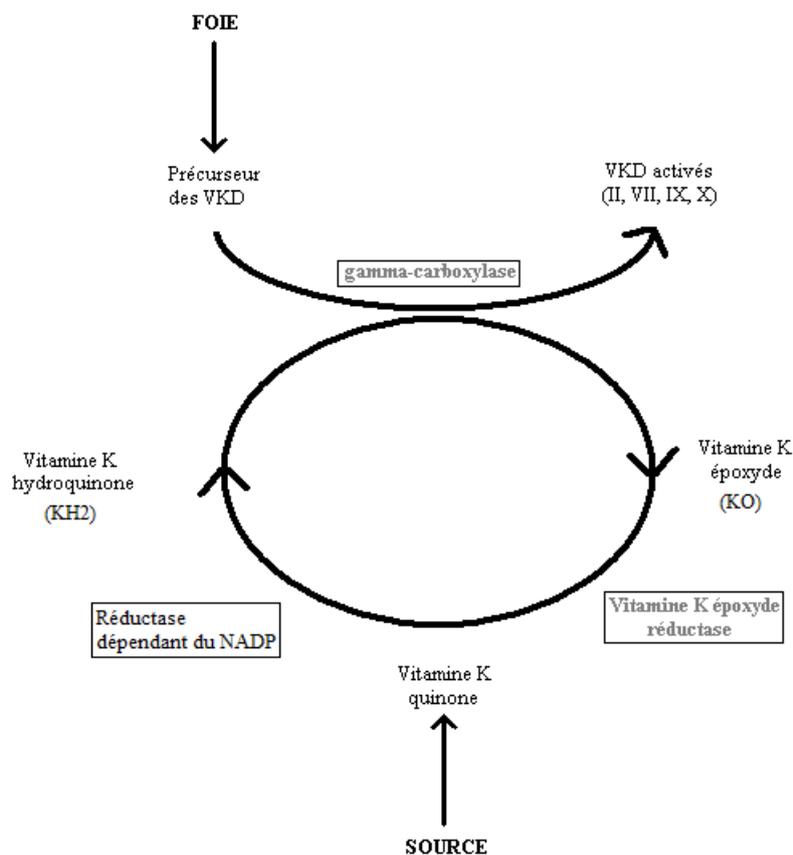
Le déficit héréditaire en facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K est caractérisé par une diminution de l'activité des facteurs II, VII, IX et X et des protéines anticoagulantes C, S et Z. Très peu de cas ont été décrits chez l'Homme. La maladie se transmet selon le mode autosomique récessif [100].

Des cas de cette coagulopathie ont été observés chez le Chat, dans des familles de Rex Devon [140, 146]. L'étude du pedigree des animaux a laissé penser à une transmission autosomique mais le mode exact de transmission reste encore à clarifier. D'après Littlewood, Dodds avait décrit une coagulopathie du même type dans une famille de Boxer en 1981 [140]; ces chiens présentaient une sensibilité majeure à la warfarine suggérant un métabolisme anormal de la warfarine ou une impossibilité d'utiliser la vitamine K pour synthétiser les facteurs de coagulation dépendants d'elle. Plus récemment, Mason et collaborateurs, en 2002, ont décrit un cas chez une femelle Labrador Retriever de 1 an [152].

b. Métabolisme de la vitamine K

Le foie synthétise les facteurs de coagulation dépendants de la vitamine K (VKD) sous une forme non mature. La γ -carboxylase convertit les groupements acide glutamique des facteurs VKD en glutamate γ -carboxylée ce qui les rend actifs par la genèse d'un module liant le calcium, permettant ainsi la liaison aux phospholipides anioniques. Pour cette réaction, la γ -carboxylase utilise la vitamine K réduite (KH_2) comme cofacteur ; KH_2 est alors oxygénée en vitamine K époxyde (KO). Le recyclage de KO est alors assuré par la vitamine K époxyde réductase, cible des thérapies anticoagulantes des dérivés coumarinés (warfarine), qui bloque alors la régénération de KH_2 . La vitamine K 2,3-époxyde réductase et la γ -carboxylase sont deux enzymes membranaires appartenant au réticulum endoplasmique et les facteurs VKD sont modifiés durant leur sécrétion par la cellule (Figure 38) [96].

Figure 38. Métabolisme de la vitamine K



Légende : cette figure montre les diverses réactions du métabolisme de la vitamine K. Les enzymes permettant ces réactions sont encadrées.

La nécessité de ces deux enzymes permet d'expliquer qu'un déficit congénital de l'une ou de l'autre entraîne une déficience en VKD.

c. Mutations

Les mutations surviennent soit sur le gène codant pour la γ -carboxylase soit sur le gène codant pour la vitamine K 2,3-époxyde réductase.

α . γ -Carboxylase

Chez l'Homme, le gène codant pour la γ -carboxylase est situé sur le chromosome 2 en position 2p12. Il s'étend sur environ 15 kilobases et contient 15 exons [155]. Des mutations sur ce gène ont été rapportées notamment par Spronk et collaborateurs en 2000 ou Darghouth et collaborateurs en 2006 [59, 199]. Littlewood et collaborateurs, en 1995, ont mesuré l'activité de la vitamine K 2,3-époxyde réductase et de la γ -carboxylase chez des chats atteints et ont montré que l'activité de la γ -carboxylase était réduite à 16 % de l'activité normale ce qui serait fortement en faveur d'un problème sur le gène codant pour cette enzyme [140].

Soute et collaborateurs avaient confirmé le déficit en γ -carboxylase dès 1992 [198].

β . Vitamine K 2,3-époxyde réductase

Le gène codant pour la vitamine K 2,3 époxyde réductase est situé sur le chromosome 16 en position 16p11.2. Chez l'Homme, il comprend environ 5 kilobases et contient 3 exons.

Des mutations ont été décrites chez l'Homme dans ce gène et ont été rapportés dans la base de données de l'OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) [175].

2. Symptômes

L'étude de Madison portant sur 3 Rex Devons en Australie a révélé [146] :

- Le premier chat était une femelle de 20 semaines présentant un hématome sur la face médiale du coude gauche ainsi qu'une hémorragie de la conjonctive droite. Un de ses frères de portée était mort 3 semaines après un épisode hémorragique ; son autopsie a révélé des hémorragies de la vessie, de l'aire sous lombaire, du canal pelvien et du périnée,

- Le deuxième animal était un chat mâle de 13 mois présentant une léthargie et une anorexie. Les examens sanguins ont montré une anémie mineure. Sa santé s'est détériorée en 24 heures et les radiographies du thorax ont révélé la présence de liquide intrathoracique. Cent millilitres de sang en nature ont alors été ponctionnés. Une de ses demi-sœurs était morte brutalement quelques mois plus tôt ; son autopsie a révélé la présence massive de sang intrathoracique non coagulé 6 heures après la mort sans trace de traumatisme,
- Le troisième chat était une sœur de portée du premier chat dont les résultats d'analyse ont montré des valeurs identiques à celles des chats atteints mais cette chatte n'a jamais présenté de signes cliniques.

Chez les chats atteints, des hématomes au niveau des sites de ponction veineuse peuvent se former aussi suite aux divers prélèvements sanguins.

Littlewood et collaborateurs, en 1995, ont rapporté le cas d'un chat mâle Rex Devon de 4 ans présentant une hémorragie persistante suite à une castration 48 heures auparavant : le scrotum était distendu et du sang s'écoulait par la plaie. Des boiteries occasionnelles de l'antérieur gauche ont alors été décrites par les propriétaires. Un autre chat ayant la même grand-mère est décédé des suites de complications hémorragiques après une chirurgie de l'abdomen [140].

Chez le Chien, Mason et collaborateurs, en 2002, ont décrit une chienne Labrador Retriever de 1 an présentant des saignements intermittents depuis la naissance. A l'âge de 7 mois un hématome est apparu spontanément sur la ligne du dos et s'est résolu de lui-même en 2 semaines. Le second épisode a eu lieu suite à la stérilisation de la chienne, et des saignements ont persisté sur le site opératoire. Une laparotomie a permis de déterminer que le sang provenait du foie et non pas du site d'ovariohystérectomie [152].

Chez l'Homme, des hémorragies intracrâniennes parfois fatales sont décrites dans les premières semaines de vie, en plus des diathèses hémorragiques rencontrées comme dans tout trouble de la coagulation [100].

3. Diagnostic

Les temps de prothrombine et de thromboplastine partiellement activés sont modérément à fortement prolongés. L'étude de l'activité des divers facteurs de la coagulation montre une diminution marquée des facteurs II, VII, IX et X. Lors d'épisodes hémorragiques aigus, une anémie peut se mettre en place. L'âge n'est pas un critère diagnostique fiable puisque les signes cliniques peuvent survenir tardivement dans la vie de l'animal.

Avant de parvenir à suspecter un trouble héréditaire, il convient de vérifier toutes les causes de réduction de l'activité des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K telles que les maladies hépatiques, la malassimilation des graisses (la vitamine K étant liposoluble, il faut une bonne assimilation des graisses pour permettre une absorption de vitamine K) ou les poisons (rodenticides, certains antibiotiques, salicylates).

Afin de déterminer si la maladie provenait d'un défaut de la γ -carboxylase ou de la vitamine K 2,3-époxyde réductase, Littlewood et collaborateurs ont rapporté que des biopsies hépatiques sur des chats atteints ont été réalisées et n'ont montré aucune élévation de la quantité de vitamine K époxyde ce qui signifiait que l'activité de la vitamine K 2,3-époxyde réductase était normale [140]. La mesure de l'activité de la γ -glutamyl carboxylase a montré une valeur égale à 16 % de la valeur normale. Les taux d'ARN_m des deux enzymes pouvaient aussi être des marqueurs de l'atteinte chez le Labrador Retriever étudié [152].

Une autre méthode permet de différencier les deux atteintes. La complémentation en vitamine K₁ sur le long terme permet de compenser le déficit de la vitamine K 2,3-époxyde réductase. En effet lorsque cette enzyme est inhibée, la réductase dépendante du NADP permet la génération de KH₂ à partir de la vitamine K provenant de l'alimentation. Aussi des temps de coagulation toujours prolongé malgré un apport chronique de vitamine K permettait de suspecter fortement un déficit en γ -carboxylase [140].

Enfin un défaut de la vitamine K 2,3-époxyde réductase est confirmable par des mesures des quantités plasmatiques de vitamine K et de KO avant et après traitement par la vitamine K.

4. Traitement

Une transfusion de sang ou plasma est souvent nécessaire pour juguler l'hémorragie en urgence. Un traitement oral avec de la vitamine K1 à la dose de 2 à 10 mg quotidiennement a permis de stopper les saignements chez les 3 chats de l'étude de Maddison et collaborateurs en 1990 [152]. L'administration intramusculaire ou sous-cutanée de vitamine K est à éviter afin d'éviter la formation d'hématomes ; une dose initiale en intraveineux peut néanmoins s'avérer intéressante [140].

En médecine humaine, l'utilisation de PPSB (riche en facteurs II, VII, IX et X) remplace les transfusions de sang ou de plasma [59].

I. DÉFICIENCES HÉRÉDITAIRES NON DÉCRITES CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES

1. Parahémophilie

La parahémophilie, ou déficience en facteur V ou maladie d'Orwen, est une maladie héréditaire identifiée pour la première fois en 1943 en Norvège par Orwen et qui présente aujourd'hui une incidence d'un cas pour 10^6 chez l'Homme. La maladie se transmet de manière autosomique récessive [224]. Les bases moléculaires de la déficience n'ont pas été déterminées que dans quelques cas [2]. A ce jour, aucun cas de parahémophilie n'a été décrit chez l'animal.

Les diathèses hémorragiques causées par la parahémophilie sont de gravité moyenne à très importante [5].

2. Déficit en facteur XIII

a. Définition et mode de transmission

Le déficit congénital en facteur XIII a été découvert par Duckert et collaborateurs, en 1960 [156]. C'est une affection héréditaire à transmission autosomique récessive. A l'heure actuelle, aucun cas de déficit congénital en facteur XIII n'a été décrit chez les carnivores domestiques.

L'hémorragie ombilicale à la naissance est la manifestation la plus précoce, la plus fréquente (87 % des cas recensés) et la plus caractéristique de la maladie. En plus des diathèses hémorragiques, la maladie est caractérisée par une anomalie de la cicatrisation des plaies [156].

3. *Flaujeac trait*

La déficience en kininogène de haut poids moléculaire ou *Flaujeac trait* (appelé encore Fitzgerald trait ou Williams trait) a été décrite pour la première fois par Lacombe en 1975 sur une femme française asymptomatique née d'un mariage consanguin. Des observations ont permis de suspecter une transmission autosomique récessive de la maladie est suspecté [225].

Les patients sont asymptomatiques et la découverte de la déficience est toujours fortuite.

Les tableaux 16 et 17 résument les caractéristiques cliniques et génétiques des troubles héréditaires de la coagulation décrits précédemment.

Il est à noter qu'à ce jour aucun cas de thrombophilies héréditaires n'a été décrit chez un carnivore domestique alors qu'elles sont systématiquement recherchées en cas de thrombose chez l'Homme.

Tableau 16. Bilan d'hémostase standard en fonction du trouble héréditaire de la coagulation

Maladie	Temps de saignement	Temps de thromboplastine partiellement activée	Temps de prothrombine	Temps de thrombine	Temps de venin de vipère Russell
Déficit en fibrinogène		Normal	Augmenté	Augmenté	
Déficit en prothrombine		Normal	Augmenté	Normal	Augmenté
Parahémophilie		Augmenté	Augmenté	Augmenté	
Déficit en facteur VII		Normal	Augmenté	Normal	Normal
Hémophilie A	Normal	Augmenté	Normal	Normal	
Hémophilie B	Normal	Augmenté	Normal	Normal	
Déficit en facteur X		Augmenté	Augmenté	Normal	Augmenté
Déficit en facteur XI		Augmenté	Normal	Normal	
Déficit en facteur XII		Augmenté	Normal	Normal	
Déficit en facteur XIII		Normal	Normal	Normal	
Déficit en prékallikréine		Augmenté	Normal	Normal	
Déficit en HWK		Augmenté	Normal	Normal	
Coagulopathie dépendante de la vitamine K		Augmenté	Augmenté		

Tableau 17. Troubles héréditaires de la coagulation (1ère partie)

Maladie	Espèces (races) atteintes*	Mode de transmission	Mutations CN / CT	Symptômes	Traitement
Déficit en fibrinogène	CN (Saint Bernard, Colley, Barzoï), H	Autosomique récessif / dominant ?	?	Hémorragies sévères	Transfusion, cryoprécipités, concentré de fibrinogène
Déficit en prothrombine	CN (Boxer), H	Autosomique récessif	?	Jeunes : épistaxis, saignements ombilicaux Adulte : contusions	Transfusion, concentrés de prothrombine
Parahémophilie	H	Autosomique récessif		Saignements modérés à rarement sévères	Transfusion
Déficit en facteur VII	CN (Beagle, Alaskan malamute, Alaskan Klee Kai, croisé), H	Autosomique dominant	Substitution exon 5	Saignements modérés	Transfusion, rVIIa, surnageant de cryoprécipités, PPSB
Hémophilie A	CN (nombreuses races), CT (nombreuses races), H	Récessif lié à l'X	Inversion intron 22 (Setter - Schnauzer) ?	Saignements modérés à sévères dont hématomes, hémarthroses	Transfusion, cryoprécipités, (concentrés de facteur VIII), rVIIa, (danazol), DDAVP Génothérapie Transplantations
Hémophilie B	CN (nombreuses races), CT (quelques races), H	Récessif lié à l'X	nombreuses	Epistaxis, hémorragies sous-cutanées et articulaires, manifestations modérés dans les petites races et sévères dans les grandes races	Transfusion, cryoprécipités, concentrés de facteur IX, PPSB Génothérapie

Tableau 18. Troubles héréditaires de la coagulation (2ème partie)

Maladie	Espèces (races) atteintes*	Mode de transmission	Mutations CN/CT	Symptômes	Traitement
Déficit en facteur X	CN (Cocker, Jack Russell), CT, H	Autosomique dominant à pénétrance incomplète	?	Saignements modérés à sévères	Transfusion, PPSB
Déficit en facteur XI	CN (Springer spaniel, Kerry Blue terrier, Montagne des Pyrénées), CT, H	Autosomique récessif	SINE dans l'exon 7	Contusions, épistaxis, ménorragies, saignements importants en post-chirurgical	Transfusion, surnageant de cryoprécipité
Déficit en facteur XII	CN (Caniche nain), CT, H	Autosomique récessif	?	Aucun symptôme	Aucun traitement nécessaire
Déficit en facteur XIII	H	Autosomique récessif		Hémorragie ombilicale Saignements modérés à sévères	Transfusion, concentré de facteur XIII
Déficit en prékallikréine	CN (Caniche), H	Autosomique récessif	?	Aucun symptôme	Aucun traitement nécessaire
Déficit en HWK	H	Autosomique récessif		Aucun symptôme	Aucun traitement nécessaire
Coagulopathie dépendante de la vitamine K	CN (Labrador), CT(Devon Rex), H	Autosomique récessif ?	?	Saignements importants (hémorragies intracrâniennes parfois létales)	Transfusion, PPSB Vitamine K1

* CN = chien, CT = chat, H = Homme

CONCLUSION

Les troubles héréditaires de l'hémostase sont des maladies dont les conséquences mettent fréquemment en jeu la vie de l'animal. Il convient donc à la médecine vétérinaire de proposer des méthodes de diagnostic plus faciles et plus accessibles mais aussi des traitements de plus en plus efficaces. Chez les carnivores domestiques, la prévalence des signes cliniques évocateurs d'un état d'hypocoagulabilité est très éloignée de la prévalence réelle ; de la même manière la recherche de causes génétiques suite à des épisodes de thrombose, ne se fait pas encore chez l'animal. Ainsi il est très délicat, à l'heure actuelle, en médecine vétérinaire, de mettre en place des programmes de lutte vis-à-vis des troubles héréditaires de l'hémostase devant la difficulté de mise en évidence de ces maladies et surtout la difficulté d'accès aux méthodes de diagnostic. En effet les études de l'hémostase en médecine humaine montrent qu'une multitude de maladies sont possibles pour expliquer ces désordres hémostatiques et les méthodes de diagnostic restent des méthodes délicates et très coûteuses.

Pour autant, le contrôle de ces maladies évolue de manière importante et la gestion notamment des animaux hémophiles, est devenue plus facile. L'étude des gènes canins et félins laissent augurer de nombreuses possibilités de traitement pour ces maladies d'autant plus que le chien est devenu un modèle d'étude très prisé pour la compréhension des maladies humaines. A l'avenir il faut s'attendre très certainement à la description de nouvelles maladies génétiques chez les carnivores domestiques suite à l'étude de leur génome mais surtout à des avancées significatives voir à la démocratisation des thérapies géniques. Toutes ces évolutions dans la compréhension de l'hémostase animale serviront sûrement à mieux aborder et traiter les maladies similaires chez l'Homme.

ANNEXE 1

REALISATION PRATIQUE D'UNE TRANSFUSION SANGUINE CHEZ LE CHIEN D'APRES

[107]

I. Le donneur

- Choix du donneur :
 - ⇒ Animal de grand taille (supérieur à 30 kg), calme et docile, en parfaite santé (un suivi régulier par un vétérinaire est nécessaire) et correctement vermifugé
- Réalisation d'un test rapide d'agglutination sur lame qui doit s'avérer négatif

II. Le prélèvement

- Sang prélevé sur animal vigile ou légèrement tranquilisé (acépromazine)
- Pose d'un cathéter jugulaire dans des conditions d'asepsie
- Quantité à prélever : environ 500 mL pour un chien de 30 kg – plus généralement seule la quantité nécessaire sera prélevée selon le calcul :

$$Q \text{ (Quantité à prélever)} = \text{Poids} \times 88 \times (\text{Hct voulu} - \text{Hct receveur}) / \text{Hct donneur}$$

[Hct = hématoците]

- Recueil du sang sur une poche en plastique contenant un anticoagulant (citrate phosphate à raison de 63 mL pour 450 mL de sang)
- Conservation à 4°C possible pendant 21 jours et moins de 9 heures à température ambiante

III. Injection au receveur

- 1) Pose d'un cathéter intraveineux de gros calibre
- 2) Administration de 5 à 10 mL/kg/heure et jusqu'à 20 mL/kg/heure chez un animal hypovolémique
- 3) Nécessité d'un monitoring pendant la transfusion (ECG, température rectale, mesure de la quantité d'urine émise)
- 4) Problème de compatibilité sanguine uniquement chez les animaux polytransfusés
- 5) Ralentir la vitesse de perfusion en cas de vomissements

IV. Risques transfusionnels

- Immédiat : prurit, érythème, urticaire → choc anaphylactique / fièvre / choc endotoxinique / tachycardie / œdème pulmonaire
- En cas d'accidents arrêter la transfusion et traiter les symptômes

ANNEXE 2

Tableau 19. LISTE DES TESTS GENETIQUES DISPONIBLES CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES POUR LES MALADIES DE L'HEMOSTASE (DECEMBRE 2008)

Maladie	Races concernées	Laboratoire
Maladie de von Willebrand (tous types)	Setter Irlandais feu et blanc	Animal Health Trust (Grande Bretagne)
	Terrier Australien, Berger Shetland, Scottish Terrier, Caniche, Epagneul Papillon, Manchester Terrier, Doberman, Bouvier Bernois	Genetic Technologies Limited (Australie)
	Caniche, Pinscher, Scottish Terrier, Shetland, Manchester Terrier, Drahtaar	Laboklin (Allemagne)
	Pinscher, Kerry Blue Terrier, Bouvier Bernois, Welsh Corgi, Epagneul Papillon, Bouvier Bernois, Coton de Tuléar, Caniche, Drahtaar, Pointer, Kooiker Hollandais, Scottish Terrier, Berger Shetland, Epagneul à Perdrix de Drente, Chien d'Arrêt Frison	VetGen (USA)
Déficit en facteur VII	Alaskan Klee Kai, Beagle, Lévrier Ecossais	PennGen (USA)
	Airedale Terrier, Alaskan Klee Kai, Beagle, Schnauzer Géant, Lévrier Ecossais	VetGen (USA)
Déficit en facteur XI	Kerry Blue Terrier	PennGen (USA)
Hémophilie B	Bull Terrier, Lhasa Apso, Labrador Retriever	Healthgene (Canada)
	Bull Terrier, Lhasa Apso, Airedale Terrier	Progenus (Belgique)
	Bull Terrier, Lhasa Apso	VetGen (USA)
Hématopoïèse cyclique	Colley	Healthgene (Canada)
		Laboklin (Allemagne)
		Progenus (Belgique)
		VetGen (USA)
		Genetic Technologies Limited (Australie)

Animal Health Trust : www.aht.org.uk ; Genetic Technologies Limited : www.gtg.com.au ; Healthgene : www.healthgene.com ; Laboklin : www.laboklin.de ; Progenus : www.progenus.be ; PennGen : <http://research.vet.upenn.edu/penngen> ; VetGen : www.vetgen.com

BIBLIOGRAPHIE

1. ACAR K., YAĞCI M., SUCAK G.T., HAZNEDAR R. Isolated prolonged activated partial thromboplastin time in an asymptomatic patient : Fletcher factor deficiency. *Thromb. Res.*, 2006, **118**, 765-766.
2. AJZNER E., BALOGH I., SZABÓ T., MAROSI A., HARAMURA G., MUSZBEK L. Severe coagulation factor V deficiency caused by 2 novel frameshift mutations : 2952delT in exon 13 and 5493insG in exon 16 of factor V gene. *Blood*, 2002, **99**, 702-705.
3. ARRUDA V.R., SCHUETTRUMPF J., HERZOG R.W., NICHOLS T.C., ROBINSON N., LOFTI Y. *et al.* Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood*, 2004, **103**, 85-92.
4. ASSELTA R., DUGA S., TENCHINI M.L. The molecular basis of quantitative fibrinogen disorders. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, **4**(10), 2115-2129.
5. BAILLARGEON L., AUBIN N., AMESSE C., LACROIX S., LUPIEN G. La déficience en facteur V (Parahémophilie). *La société canadienne de l'hémophilie*, 2006, 20 p.
6. BAY J.D., SCOTT M.A., HANS J.E. Reference values for activated coagulation time in cats. *Am. J. Vet. Res.*, 2000, **61**(7), 750-753.
7. BENN D.M., GENTRY P.A., JOHNSTONE I.B. Classic hemophilia (hemophilia A) in a family of Collies. *Can. Vet. J.*, 1978, **19**, 121-125.
8. BENSON K.F., LI F.Q., PERSON R.E., ALBANI D., DUAN Z., WECHSLER J. *et al.* Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophilic elastase. *Nat. Genet.*, 2003, **35**(1), 90-96.

9. BOUDREAUX M.K., CATALFAMO J.L. Molecular and genetic basis for thrombasthenic thrombopathia in otterhounds. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**(11), 1797-1804.
10. BOUDREAUX M.K., CATALFAMO J.L., KLOK M. Calcium-diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor I gene mutations associated with loss of function in canine patients. *Trans. Res.*, 2007, **150**(2), 81-92;
11. BOUDREAUX M.K., CRAGER C., DILLON A.R., STANZ K., TOIVOI-KINNUCAN M. Identification of an intrinsic platelet function defect in Spitz dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 1994, **8**(2), 93-98.
12. BOUDREAUX M.K., DILLON A.R. The effect of danazol treatment on factor IX deficiency cats. *Vet. Clin. Pathol.*, 1988, **17**(4), 84-85.
13. BOUDREAUX M.K., DODDS W.J., SLAUSON D.O., CATALFAMO J.L. Evidence for regulatory control of canine platelet phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **140**(2), 589-594.
14. BOUDREAUX M.K., DODDS W.J., SLAUSON D.O., CATALFAMO J.L. Impaired cAMP metabolism associated with anomalous function of thrombopathic canine platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **140**(2), 595-601.
15. BOUDREAUX M.K., LIPSCOMB D.L. Clinical, biochemical, and molecular aspects of Glanzmann's thrombasthenia in humans and dogs. *Vet. Pathol.*, 2001, **38**(3), 249-260.
16. BOUVIER C. *Les troubles héréditaires de l'hémostase primaire dans l'espèce canine. Etude expérimentale d'une thrombopathie chez le Bouvier bernois.* Thèse Méd. Vét., Lyon, 2004, n°26, 168 p.
17. BRDECKA D.J., ADIN C.A., BOUDREAUX M.K., CRAWFORD P.C., RANDALL S.R. Successful ovariectomy in a dog with Glanzmann thrombasthenia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2004, **11**(1), 1796-1798.

18. BRINKHOUS K.M., DAVIS P.D., GRAHAM J.B., DODDS W.J. Expression and linkage of genes for X-linked hemophilias A and B in the dog. *Blood*, 1973, **41**(4), 577-585.
19. BRINKHOUS K.M., HEDNER U., GARRIS J.B., DINESS V., READ M.S. Effect of recombinant factor VIIa on the hemostatic defect in dogs with hemophilia A, hemophilia B, and von Willebrand disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, **86**, 1382-1386.
20. BRINKHOUS K.M., SIGMAN J.L., READ M.S., STEWART P.F., MCCARTHY K.P., TIMONY G.A. *et al.* Recombinant human factor IX : replacement therapy, prophylaxis, and pharmacokinetics in canine hemophilia B. *Blood*, 1996, **88**(7), 2603-2610.
21. BROOKS M. Hereditary bleeding disorders in dogs and cats. *Vet. Med.*, 1999, **94**, 555-564.
22. BROOKS M., DEWILDE L. Feline factor XII deficiency. *Comp. Cont. Educ. Vet. Pract.*, 2006, **28**(2), 148-155.
23. BROOKS M.B., BARNAS J.L., FREMONT J., RAY J. Cosegregation of a factor VIII microsatellite marker with mild hemophilia A in Golden retriever dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 2005, **19**, 205-210.
24. BROOKS M.B., CATALFAMO J.L., BROWN A., IVANOVA P., LOVAGLIO J. A hereditary bleeding disorder of dogs caused by a lack of platelet procoagulant activity. *Blood*, 2002, **99**, 2434-2441.
25. BROOKS M.B., DODDS W.J. Factor IX deficiency (Hemophilia B) in two male domestic short-hair cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1989, **25**, 153-155.
26. BROOKS M.B., DODDS W.J., RAYMOND S.L. Epidemiologic features of von Willebrand's disease in Doberman pinschers, Scottish terriers, and Shetland sheepdogs : 260 cases (1984-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992, **200**(12), 1123-1127.

27. BROOKS M.B., ERB H.N., FOUREMAN P.A., RAY K. Von Willebrand disease phenotype and von Willebrand factor marker genotype in Doberman pinschers. *Am. J. Vet. Res.*, 2001, **62**(3), 364-369.
28. BROOKS M.B., GU W., BARNAS J.L., RAY J., RAY K. A line 1 insertion in the factor IX gene segregates with mild hemophilia B in dogs. *Mamm. Genome*. 2003, **14**(11), 788-795.
29. BROOKS M.B., GU W., RAY K. Complete deletion of factor IX gene and inhibition of factor IX activity in a Labrador retriever with hemophilia B. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **211**(11), 1418-1421.
30. BROOKS M.B., McNGUYEN R., HALL R., GUPTA R., BOOTH J.G. Indirect carrier deletion of canine hemophilia A using *factor VIII* microsatellite markers. *Anim. Genet.*, 2008, **39**, 278-283.
31. BROOKS M.B., RAYMOND S., CATALFAMO J. Severe, recessive von Willebrand disease in German Wirehaired Pointers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **209**(5), 930-933.
32. BROWN B.D., SHI C.X., POWELL S., HURLBUT D., GRAHAM F.L., LILLICRAP D. Helper-dependent adenoviral vectors mediate therapeutic factor VIII expression for several months with minimal accompanying toxicity in a canine model of severe hemophilia A. *Blood*, 2004, **103**, 804-810.
33. BRUNETTI-PIERRE N., NICHOLS T.C., McCORQUODALE S., MERRICKS E., PALMER D.J., BEAUDET A.L. *et al.* Sustained phenotypic correction of canine hemophilia B after systemic administration of helper-dependent adenoviral vector. *Hum. Gene Ther.*, 2005, **16**, 811-820.
34. CALLAN M.B., ALJAMALI M.N., GRIOT-WENK M.E., POLLAK E.S., WERNER P., GIGER U. *et al.* Molecular characterization of hereditary factor VII deficiency in the Beagle. *J. Vet. Intern. Med.*, 2005, **19**, 448-449.

35. CALLAN M.B., ALJAMALI M.N., MARGARITIS P., GRIOT-WENK M.E., POLLAK E.S., WERNER P. et al. A novel missense mutation responsible for factor VII deficiency in research Beagle colonies. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, **4**(12), 2616-2622.
36. CALLAN M.B., BENNETT J.S., PHILLIPS D.K., HASKINS M.E., HAYDEN J.E., ANDERSEN J.G. et al. Inherited platelet delta-storage pool disease in dogs causing severe bleeding : an animal model for a specific ADP deficiency. *Thromb. Haemost.*, 1995, **74**(3), 949-953.
37. CALLAN M.B., GIGER U., CATALFAMO J.L. Effect of desmopressin on von Willebrand factor multimers in Doberman Pinschers with type 1 von Willebrand disease. *Am. J. Vet. Res.*, 2005, **66**, 861-867.
38. CALLAN M.B., GRIOT-WENK M.E., HACKNER S.G., GIGER U. Persistent thrombopathy causing bleeding in 2 domestic shorthaired cats. *J. Vet. Intern. Med.*, 2000, **14**, 217-220.
39. CALLAN M.B., WALTON R., JEZYK P.F., GIGER U. Thrombopathies causing bleeding in a Boxer and mixed-breed dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 2001, **37**, 244-250.
40. CAMPBELL K.L., GREENE C.E., DODDS W.J. Factor IX deficiency (hemophilia B) in a Scottish terrier. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1983, **182**(2), 170-171.
41. CARR A.P., PANCIERA D.L. Von Willebrand's disease and other hereditary coagulopathies. In : BONAGURA J.D., editors. *Kirk's current veterinary therapy XIII. Small animal practice*. 13th ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 2000, 434-438.
42. CATALFAMO J.L., DODDS W.J. Hereditary and acquired thrombopathias. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.*, 1988, **18**(1), 185-193.
43. CATALFAMO J.L., RAYMOND S.L., WHITE J.G., DODDS W.J. Defective platelet-fibrinogen interaction in hereditary canine thrombopathia. *Blood*, 1986, **67**, 1568-1577.

44. CHABRE B., CORLOUER J.P. Etude retrospective de 101 cas d'affection de l'hémostase. *Point Vét.*, 1994, **25**(157), 865-875.
45. CHARLET K. *Principales maladies héréditaires ou présumées héréditaires dans l'espèce canine. Bilan des prédispositions raciales*. Thèse Méd. Vét., Alfort, 2004, n°163, 233 p.
46. CHING Y.N.L.H., MEYERS K.M., BRASSARD J.A., WARDROP K.J. Effects of cryoprecipitate and plasma von Willebrand factor multimers and bleeding-time in Doberman Pinschers with type-1 von Willebrand disease. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**(1), 102-110.
47. CHINN D.R., DODDS W.J., SELCER B.A. Prekallikrein deficiency in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1986, **188**(1), 69-71.
48. CHUAH M.K.L., SCHIEDNER G., THORREZ L., BROWN B., JOHNSTON M., GILLINJS V. *et al.* Therapeutic factor VIII levels and negligible toxicity in mouse and dogs of hemophilia A following gene therapy with high-capacity adenoviral vectors. *Blood*, 2003, **101**(5), 1734-1743.
49. CHURCH F.C. Brief overview of thrombin. In : *University of North Caroline at Chapel Hill – Laboratory of Franck C. Church*. [En ligne] Consultée le 07 décembre 2008, [<http://serpins.med.unc.edu/~fcc/ResearchPicts2006/Thrombin.html>]
50. CLARK P., BOWDEN D.K., PARRY B.W. Studies to detect carriers of haemophilia A in German shepherd dogs using diagnostic DNA polymorphisms in the human factor VIII gene. *Vet. J.*, 1997, **153**, 71-74.
51. CLARK P., HOOPER C., MACDONALD M. Haemophilia A in litter Siberian huskies. *N. Z. Vet. J.*, 2000, **48**, 60-62.
52. COLGAN S.P., HULL THRALL M.A., GASPER P.W. Platelet aggregation and ATP secretion in whole blood of normal cats and cats homozygous and heterozygous for Chédiak-Higashi syndrome. *Blood Cells*, 1989, **15**(3), 585-595.

53. CONNELLY S., MOUNT J., MAUSER A., GARDNER J.M., KALEKO M., MCCLELLAND A. *et al.* Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy. *Blood*, 1996, **88**(10), 3846-3853.
54. COOK A.K., WERNER L.L., O'NEILL S.L., BROOKS M., FELDMAN B.F. Factor X deficiency in a Jack Russell terrier. *Vet. Clin. Pathol.*, 1993, **22**(3), 68-71.
55. COTTER S.M., BRENNER R.M., DODDS W.J. Hemophilia A in three unrelated cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1978, **172**(2), 166-169.
56. COWLES B.E., MEYERS K.M., WARDROP K.J., MENARD M., SYLVESTER D. Prolonged bleeding time of Chédiak-higashi cats corrected by platelet transfusion. *Thromb. Haemost.*, 1992, **67**(6), 708-712.
57. DALE D.C., RODGER E., CEBON J., RAMESH N., HAMMOND W.P., ZSEBO K.M. Long-term treatment of canine cyclic hematopoiesis with recombinant canine stem cell. *Blood*, 1995, **85**, 74-79.
58. DALY M.L., GIGER U. A rodenticide exposed and bleeding beagle dog with hereditary factor VII deficiency. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 2007, **17**(2), 170-174.
59. DARGHOOUTH D., HALLGREN K.W., SHTOFMAN R.L., MRAD A., GHARBI Y., MAHERZI A. *et al.* Compound heterozygosity of novel missense mutations in the gamma-glutamyl-carboxylase gene causes hereditary combined vitamin K-dependent coagulation factor deficiency. *Blood*, 2006, **108**, 1925-1931.
60. DE MEYER S.F., VANHOORELBEKE K., CHUAH M.K., PAREYN I., GILLIJNS V., HEBBEL R.P. *et al.* Phenotypic correction of von Willebrand disease type 3 blood-derived

endothelial cells with lentiviral vectors expressing von Willebrand factor. *Blood*, 2006, **107**, 4728-4736.

61. DI GIACOMO R.F., HAMMOND W.P., KUNZ L.L., COX P.A. Clinical and pathological features of cyclic hematopoiesis in Grey Collie dogs. *Am. J. Pathol.*, 1983, **111**(2), 224-233.
62. DILLON A.R., BOUDREAUX M.K. Combined factors IX and XII deficiencies in a family of cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1988, **193**(7), 833-834.
63. DODDS W.J. Canine factor X (Stuart-Prower factor) deficiency. *J. Lab. Clin. Med.*, 1973, **82**(4), 560-566.
64. DODDS W.J. Further studies of canine von Willebrand's disease. *Blood*, 1975, **45**, 221-230.
65. DODDS W.J., BROOKS M.B., CATALFAMO J., ERB H., STOKOL T. Responses to von Willebrand factor study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **209**(11), 1238-1240.
66. DUGA S., ASSELTA R., SANTAGOSTINO E., ZEINALI S., SIMONIC T., MALCOVATI M. *et al.* Missense mutations in the human β fibrinogen gene cause congenital afibrinogenemia by impairing fibrinogen secretion. *Blood*, 2000, **95**(4), 1336-1341.
67. DUNN K.J., NICHOLLS P.K., DUNN J.K., HERRTAGE M.E. Intracranial haemorrhage in a Doberman puppy with von Willebrand disease. *Vet. Rec.*, 1995, **136**(25), 635-636.
68. EHRHARDT A., XU H., DILLOW A.M., BELLINGER D.A., NICHOLS T.C., KAY M.A. A gene-deleted adenoviral vector results in phenotypic correction of canine hemophilia B without liver toxicity or thrombocytopenia. *Blood*, 2003, **102**(7), 2403-2411.
69. EVANS J.P., BRINKHOUS K.M., BRAYER G.D., REISNER H.M., HIGH K.A. Canine hemophilia B resulting from a point of mutation with unusual consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1989, **86**, 10095-10099.

70. EVANS J.P., WATZKE H.H., WARE J.L., STAFFORD D.W., HIGH K.A. Molecular cloning of a cDNA encoding canine factor IX. *Blood*, 1989, **74**, 207-212.
71. FELDMAN D.G., BROOKS M.B., DODDS W.J. Hemophilia B (factor IX deficiency) in a family of German shepherd dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, **206**(12), 1901-1905.
72. FEWELL J.G., MACLAUGHLIN F., MEHTA V., GONDO M., NICOL F., WILSON E. *et al.* Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. *Mol. Ther.*, 2001, **3**(4), 574-583.
73. FITCH R., WARDROP J. Hemophilia A in a German shepherd dog. *Can. Pract.*, 1992, **17**(6), 19-23.
74. FOGH J.M., FOGH I.T. Inherited coagulation disorders. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.*, 1988, **18**(1), 231-242.
75. FRENCH T.W., FOX L.E., RANDOLPH J.F., DODDS W.J. A bleeding disorder (von Willebrand's disease) in a Himalayan cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1987, **190**(4), 437-439.
76. FUCHS R.J., LEVIN J., TADEL M., MERRITT W. Perioperative coagulation management in a patient with afibrinogenemia undergoing liver transplantation. *Liver Transpl.*, 2007, **13**, 752-756.
77. FUJIKAWA K. Historical perspective of factor XI. *Thromb. Res.*, 2005, **115**, 441-450.
78. FURLANELLO T., CALDIN M., STOCCO A., TUDONE E., TRANQUILLO V., LUBAS G. *et al.* Stability of stored canine plasma for hemostasis testing. *Vet. Clin. Pathol.*, 2006, **35**(2), 204-207.
79. GALLO-PENN A.M., SHIRLEY P.S., ANDREWS J.L., TINLIN S., WEBSTER S., CAMERON C. *et al.* Systemic delivery of an adenoviral vector encoding canine factor VIII

results in short-term phenotypic correction, inhibitor development, and biphasic liver toxicity in hemophilia A dogs. *Blood*, 2001, **97**, 107-113.

80. GAREWAL H.S., CORRIGAN J.J., DURIE B.G.M., JETER M.A., LOU DAMIANO M. Effect of danazol on coagulation parameters and bleeding in hemophilia. *J. Am. Med. Assoc.*, 1985, **253**(8), 1154-1156.
81. GEORGE J.N., CAEN J.P., NURDEN A.T. Glanzmann's thrombasthenia : the spectrum of clinical disease. *Blood*, 1990, **75**(7), 1383-1395.
82. GERBER B., TABOADA J., LOTHROP Jr. C.D., BUSATO A., HOSGOOD G., GOODMAN S.A. *et al.* Determination of normal values using an automated coagulation timer for activated coagulation time and its application in dogs with hemophilia. *J. Vet. Intern. Med.*, 1999, **13**, 433-436.
83. GERMANOS-HADDAD M., NEERMAN-ARBEZ M., DE MOERLOOSE P. Le facteur XI : des déficits constitutionnels à un nouveau schéma de la coagulation. *In : Revue Médicale Suisse*. [En ligne] 07 décembre 2008, [<http://titan.medhyg.ch/mh/formation/article.php3?sid=22661>]
84. GILES A.R., TINLIN S., BROSSEAU L., HOOGENDOORN H. In vivo studies of the role of factor VII in hemostasis. *Blood*, 1985, **65**(5), 1197-1200.
85. GOOKIN J.L., BROOKS M.B., CATALFAMO J.L., BUNCH S.E., MUÑANA K.R. Factor X deficiency in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **211**(5), 576-579.
86. GOREE M., CATALFAMO J.L., ABER S., BOUDREAUX M.K. Characterization of the mutations causing hemophilia B in 2 domestic cats. *J. Vet. Intern. Med.*, 2005, **19**, 200-204.
87. GRALNICK H.R., RICK M.E. Danazol increases factor VIII and factor IX in classic hemophilia and Christmas disease. *N. Eng. J. Med.*, 1983, **308**(23), 1393-1395.

88. GREEN R.A., WHITE F. Feline factor XII (Hageman) deficiency. *Am. J. Vet. Res.*, 1977, **38**(6), 893-895.
89. GU W., BROOKS M.B., CATALFAMO J.L., RAY J., RAY K. Two distinct mutations cause severe hemophilia B in two unrelated canine pedigrees. *Thromb. Haemost.*, 1999, **82**(4), 1270-1275.
90. GUELFY J.F., DIQUELOU A. L'exploration biologique de l'hémostase chez le chien. *Point Vét.*, 1994-1995, **26**(164), 755-759.
91. GUELFY J.F., DIQUELOU A. L'hémophilie A du chien. *Point Vét.*, 1996, **28**, 505-508.
92. GUYADER G. *Dosage des facteurs de la coagulation et de leurs inhibiteurs chez le chien.* Thèse Méd. Vét., Nantes, 1995, n°4, 42 p.
93. HABERICHTER S.L., JACOBI P., MONTGOMERY R.R. Critical independent regions in the VWF propeptide and mature VWF that enable normal VWF storage. *Blood*, 2003, **101**(4), 1384-1391.
94. HADJKACEM B., ELLEUCH H., GARGOURI J. Bernard-Soulier syndrome : a novel missense mutation in GPIIb gene affecting GPIIb-IX complex expression. *Ann. Hematol.*, 2008 (en cours d'impression).
95. HALL D.E. The haemostatic mechanism and its components in the dog. *In : Blood coagulation and its disorders in the dog.* Baltimore : Williams and Wilkins, 1972, 1-33.
96. HAMOSH A. Vitamin K epoxyde reductase complex, subunit 1 ; VKORC 1. *In : Online Mendelian Inheritance in Man.* [En ligne] 07 décembre 2008, [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=608547>].

97. HARDING T.C., KOPRIVNIKAR K.E., TU G.H., ZAYEK N., LEW S., SUBRAMANIAN A. *et al.* Intravenous administration of an AAV-2 vector for the expression of factor IX in mice and a dog model of hemophilia B. *Gene Ther.*, 2004, **11**, 204-213.
98. HARRISSON P., CRAMER E.M. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.*, 1993, **7**(1), 52-62.
99. HAURIE C., PERSON R., DALE D.C., MACKEY M.C. Hematopoietic dynamics in grey collie. *Exp. Hematol.*, 1999, **27**, 1139-1148.
100. HECQUET D. *Troubles de l'hémostase chez le chat : étude bibliographique*. Thèse Méd. Vét., Toulouse, 2006, n°50, 180 p.
101. HESELTINE J.C., PANCIERA D.L., TROY G.C., MONROE W.E., BROOKS M.B., FELDMAN B.F. Effect of levothyroxine administration on hemostatic analytes in Doberman Pinschers with von Willebrand disease. *J. Vet. Intern. Med.*, 2005, **19**, 523-527.
102. HIGH K.A. The leak stops here : platelets as delivery vehicles for coagulation factors. *J. Clin. Invest.*, 2006, **116**(7), 1840-1842.
103. HILL B.L., ZENOBLE R.D., DODDS W.J. Prothrombin deficiency in a Cocker spaniel. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1982, **181**(3), 262-263.
104. HOLMES N.G., SHAW S.C., DICKENS H.F., COOMBES L.M., RYDER E.J., LITTLEWOOD J.D. *et al.* Von Willebrand's disease in UK Dobermans : possible correlation of a polymorphic DNA marker with disease status. *J. Small. Anim. Pract.*, 1996, **37**(7), 307-308.
105. HORWITZ M., BENSON K.F., PERSON R.E., APRIKYAN A.G., DALE D.C. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat. Genet.*, 1999, **23**(4), 433-436.

- 106.HOUGH C., KAMISUE S., CAMERON C., NOTLEY C., TINLIN S., GILES A. *et al.* Aberrant splicing and premature termination of transcription of the FVIII gene as a cause of severe canine hemophilia A : similarities with the intron 22 inversion mutation in human hemophilia. *Thromb. Haemost.*, 2002, **87**(4), 659-665.
- 107.JACQUEMIN N. Conduite pratique d'une transfusion chez le chien. *Point Vét.*, 1999, **30**(202), 539-544.
- 108.JAYANDHARAN G., VISWABANDYA A., BAIDYA S., NAIR S.C., SHAJI R.V., CHANDY M. *et al.* Molecular genetics of hereditary prothrombin deficiency in Indian patients : identification of a novel Ala362 → Thr (Prothrombin Vellore 1) mutation. *J. Thromb. Haemost.*, 2005, **3**(7), 1446-1453.
- 109.JEDLITSCHKY G., TIRSCHMANN K., LUBENOW L.E., NIEUWENHUIS H.K., AKKERMAN J.W., GREINACHER A. *et al.* The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage. *Blood*, 2004, **104**(12), 3603-3610.
- 110.JERGENS A.E., TURRENTINE M.A., KRAUS K.H., JOHNSON G.S. Buccal mucosa bleeding times of healthy dogs and dogs in various pathologic states, including thrombocytopenia, uremia and von Willebrand's disease. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, **48**(9), 1337-1342.
- 111.JIANG H., LILICRAP D., PATARROYO-WHITE S., LIU T., QIAN X., SCALLAN C.D. *et al.* Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2,6, and 8 delivering factor VIII hemophilia A mice and dogs. *Blood*, 2007, **108**, 107-115.
- 112.JOHNSTONE I.B. Multimeric analysis of von Willebrand factor in animal plasmas using sodium dodecyl sulfate agarose gel electrophoresis, semidry electrotransfer, and immunoperoxidase detection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1997, **9**, 314-317.

113. JOHNSTONE I.B., CRANE S. The effects of desmopressin on plasma factor VII / von Willebrand factor activity in dogs with von Willebrand's disease. *Can. J. Vet. Res.*, 1987, **51**, 189-193.
114. JOHNSTONE I.B., CRANE S. Von Willebrand's disease in two families of Doberman pinschers. *Can. Vet. J.*, 1981, **22**, 239-243.
115. JOHNSTONE I.B., LOTZ F. An inherited platelet function defect in Basset hounds. *Can. Vet. J.*, 1979, **20**, 211-215.
116. JOHNSTONE I.B., MORTON J.C., ALLEN D.G. Factor VIII deficiency in a cat. *Can. Vet. J.*, 1987, **28**(10), 671-673.
117. JONES J.B., LANGE R.D., JONES E.S. Cyclic hematopoiesis in a colony of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1975, **166**(4), 365-367.
118. JOSEPH S.A., BROOKS M.B., COCCARI P.J., RIBACK S.C. Hemophilia A in a German shorthaired pointer : clinical presentations and diagnosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1996, **32**, 25-28.
119. KAAE J.A., CALLAN M.B., BROOKS M.B. Hereditary factor VII deficiency in the Alaskan Klee Kai dog. *J. Vet. Intern. Med.*, 2007, **21**, 976-981.
120. KAY M.A., LANDEN C.N., ROTHENBERG S.R., TAYLOR L.A., LELAND F., WIEHLE S. *et al.* *In vivo* hepatic gene therapy : complete albeit transient correction of factor IX deficiency in hemophilia B dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 2353-2357.
121. KEMBALL-COOK G., TUDDENHAM E.G.D., WACEY A.I. The factor VIII structure and mutation resource site : HAMSTeRS Version 4. *Nucleic Acids Res.*, 1998, **26**(1), 216-219.
122. KIER A.B., BRESNAHAN J.F., WHITE F.J., WAGNER J.E. The inheritance pattern of factor XII (Hageman) deficiency in domestic cats. *Can. J. Comp. Med.*, 1980, **44**, 309-314.

- 123.KIER A.B., MCDONNELL J.J., STERN A. The Arthus reaction in cats deficient in Hageman factor (factor XII). *J. Comp. Path.*, 1990, **102**, 33-47.
- 124.KNOWLER C., GIGER U., DODDS W.J., BROOKS M.B. Factor XI deficiency in Kerry Blue Terriers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1994, **205**(11), 1557-1561.
- 125.KO S., TANAKA I., KANEHIRO H., KANOKOGI H., ORI J., SHIMA M. *et al.* Preclinical experiment of auxiliary partial orthotopic liver transplantation as a curative treatment for hemophilia. *Liver Transpl.*, 2005, **11**(5), 579-584.
- 126.KO S., TANAKA I., KANOKOGI H., KANEHIRO H., OKAYAMA J., ORI J. *et al.* Efficacy of auxiliary partial orthopedic liver transplantation for cure of hemophilia in a canine hemophilia A model. *Transplant. Proc.*, 2005, **37**, 1131-1133.
- 127.KRAMER J.W., DAVIS W.C., PRIEUR D.J. The Chédiak-Higashi syndrome of cats. *Lab. Invest.*, 1977, **36**(5), 554-562.
- 128.KRAMER J.W., VENTA P.J., KLEIN S.R., CAO Y., SCHALL W.D., YUZBASIYAN-GURKAN V. A von Willebrand's factor genomic nucleotide variant and polymerase chain reaction diagnostic test associated with inheritable type-2 von Willebrand's disease in a line of German shorthaired pointer dogs. *Vet. Pathol.*, 2004, **41**, 221-228.
- 129.KRISTENSEN A.T., EDWARDS M.L., DEVEY J. Potential uses of recombinant human factor VIIa in veterinary medicine. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 2003, **33**(6), 1437-1451.
- 130.KUPKER H.G., HANNA B.L., KINNE D.R. Congenital factor VII deficiency with normal Stuart activity : clinical, genetic and experimental observations. *Blood*, 1960, **15**, 146-163.
- 131.LACOSTE S. *L'hémophilie A et B chez le chien et le chat. Etude bibliographique.* Thèse Méd. Vét., Toulouse, 2000, n°59, 210 p.

- 132.LANGDELL R.D., WAGNER R.H., BRINKHOUS K.M. Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting test : presumption test for hemophilic and simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. *J. Lab. Clin. Med.*, 1953, **41**, 637-647.
- 133.LANZA F. Bernard-Soulier syndrome (Hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet J. Rare Dis.*, 2006, **1**, 46.
- 134.LEON C., ALEX M., KLOCKE A., MORGENSTERN E., MOOSBAUER C., ECKLY A. *et al.* Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood*, 2003, **103**(2), 594-600.
- 135.LIPSCOMB D.L., BOURNE C., BOUDREAUX M.K. Two genetic defects in α_{IIb} are associated with type I Glanzmann's thrombasthenia in a Great Pyrenees dog : a 14-base insertion in exon 13 and a splicing defect of intron 13. *Vet. Pathol.*, 2000, **37**, 581-588.
- 136.LITTLEWOOD J.D. Haemophilia A (factor VIII deficiency) in German shepherd dogs. *J. Small Anim. Pract.*, 1988, **29**, 117-128.
- 137.LITTLEWOOD J.D. Haemophilia A (Factor VIII deficiency) in the cat. *J. Small Anim. Pract.*, 1986, **27**, 541-546.
- 138.LITTLEWOOD J.D., EVANS R.J. A combined deficiency of factor VIII and contact activation defect in a family of cats. *Br. Vet. J.*, 1990, **146**, 30-35.
- 139.LITTLEWOOD J.D., MATIC S.E., SMITH N. Factor IX deficiency (haemophilia B, Christmas disease) in a crossbred dog. *Vet. Rec.*, 1986, **118**, 400-401.
- 140.LITTLEWOOD J.D., SHAW S.C., COOMBES L.M. Vitamin K-dependent coagulopathy in a british devon rex cat. *J. Small. Anim. Pract.*, 1995, **36**, 115-118.
- 141.LÓPEZ J.A., ANDREWS R.K., AFSHAR-KHARGHAN V., BERNDT M.C. Bernard-Soulier syndrome. *Blood*, 1998, **91**(12), 4397-4418.

- 142.LOTHROP C.D., CANDLER R.V., PRATT H.L., URSO I.M., JONES J.B., CARROLL R.C. Characterization of platelet function in cyclic hematopoietic dogs. *Exp. Hematol.*, 1991, **19**(9), 916-922.
- 143.LOZIER J.N., DUTRA A., PAK E., ZHOU N., ZHENG Z., NICHOLS T.C. *et al.* The Chapel Hill hemophilia A dog colony exhibits a factor VIII gene inversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, **99**(20), 12991-12996.
- 144.LUND J.E., PADGETT G.A., OTT R.L. Cyclic neutropenia in Grey Collie dogs. *Blood*, 1967, **29**(4), 452-461.
- 145.MACPHERSON R., SCHERER J., ROSS M.L., GENTRY P.A. Factor VII deficiency in a mixed breed dog. *Can. Vet. J.*, 1999, **40**, 503-505.
- 146.MADDISON J.E., WATSON A.D.J., EADE I.G., EXNER T. Vitamin K-dependent multifactor coagulopathy in devon rex cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1990, **197**(11), 1495-1497.
- 147.MAGGIO-PRICE L., DODDS W.J. Factor IX deficiency (Hemophilia B) in a family of British shorthair cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993, **203**(12), 1702-1704.
- 148.MANSELL P.D., PARRY B.W. Carrier detection in human and canine haemophilia A. *Vet. Bull.*, 1992, **62**(10), 999-1007.
- 149.MANSELL P.D., PARRY B.W., ANDERSON G.A. Detection of canine carriers of haemophilia A using factor VIII activity and von Willebrand factor antigen concentration. *Prev. Vet. Med.*, 1993, **16**, 133-139.
- 150.MARCUS A.J., BROEKMAN M.J., DROSOPOULOS J.H.F., ISLAM N., ALYONYCHEVA T.N., SAFIER L.B. *et al.* The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J. Clin. Invest.*, 1997, **99**(6), 1351-1360.
- 151.MARRON B.M., ROBINSON J.L., GENTRY P.A., BEEVER J.E. Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. *Anim. Genet.*, 2004, **35**(6), 454-456.

- 152.MASON D.J., ABRAMS-OGG A., ALLEN D., GENTRY P.A., GADD K.R. Vitamin K-dependent coagulopathy in a Black Labrador retriever. *J. Vet. Intern. Med.*, 2002, **16**, 485-488.
- 153.MAUSER A.E., WHITLARK J., WHITNEY K.M., LOTHROP Jr C.D. A deletion mutation causes hemophilia B in Lhasa Apso dogs. *Blood*, 1996, **88**(9), 3451-3455.
- 154.MCCONNELL M.F. *Haemostatic diagnostic techniques*. In : DAY M., MACKIN A., LITTLEWOOD J. Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. British Small Anim. Vet. Assoc. 2000, 173-181.
- 155.McKUSICK V.A. Gamma-glutamyl carboxylase ; GGCX. In : *Online Mendelian Inheritance in Man*. [En ligne] 07 décembre 2008, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=137167&a=137167_AllelicVariant0001]
- 156.MEDHAFFAR M., ELLOUMI M., GUERMAZI S., KALLEL C., MSEDDE S., BELLAJ H. et al. Déficit congénital en facteur XIII de la coagulation dans le sud tunisien. *Patho. Bio.*, **S4**, 2006, 349-352.
- 157.MEIJERS J.C.M., TEKELENBURG W.L.H., BOUMA B.N., BERTINA R.M., ROSENDAAL F.R. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N. Eng. J. Med.*, 2000, **342**(10), 696-701.
- 158.MEYERS K.M., HOPKINS G., HOLMSEN H., BENSON K., PRIEUR D.J. Ultrastructure of resting and activated storage pool deficient platelets from animals with the Chédiak-Higashi syndrome. *Am. J. Physiol.*, 1982, 364-376.
- 159.MILLS J.M., LABUC R.H., LAWLEY M.J. Factor VII deficiency in an Alaskan malamute. *Aus. Vet. J.*, 1997, **17**(5), 320-322.

- 160.MISCHKE R. Activated partial thromboplastine time as a screening test of minor or moderate coagulation factor deficiencies for canine plasma : sensitivity of different commercial reagents. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2000, **12**, 433-437.
- 161.MONAHAN P.E., SAMULSKI R.J., TAZELAAR J., XIAO X., NICHOLS T.C., BELLINGER D.A. *et al.* Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther.*, 1998, **5**, 40-49.
- 162.MORALES F., COUTO C.G., IAZBIK M.C. Effects of 2 concentrations of sodium citrate on coagulation test results, von Willebrand factor concentration, and platelet function in dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 2007, **21**, 472-475.
- 163.MOSER J., MEYERS K.M., RUSON R.H. Inheritance of von Willebrand factor deficiency in Doberman pinschers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **209**(6), 1103-1106.
- 164.MOUNT J.D., HERZOG R.W., TILLSON D.M., GOODMAN S.A., ROBINSON N., MCCLELAND M.L. *et al.* Sustained phenotypic correction of haemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood*, 2002, **99**, 2670-2676.
- 165.MURTAUGH R.J., DODDS W.J. Hemophilia A in a female dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1988, **193**(3), 351-352.
- 166.NAGLE D.L., KARIM M.A., WOOLF E.A., HOLMGREN L., BORK P., MISUMI D.J. *et al.* Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat. Genet.*, 1996, **14**(3), 307-311.
- 167.NAKATA M., SAKAI M., SAKAI T. Hemophilia B in crossbred maltese dog. *J. Vet. Med. Sci.*, 2006, **68**(11), 1223-1224.
- 168.NAKAZAWA F., KANNEMEIER C., TRUSHEIM H., KOYAMA T., PREISSNER K.T. An intracellular cofactor of Factor VII activating protease (FSAP) functions as an initiator of blood coagulation. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, 1, supplement 1.

- 169.NICHOLS T.C., BELLINGER D.A., REDDICK R.L., SMITH S.V., KOCH G.G., DAVIS K. *et al.* The roles of von Willebrand factor and factor VIII in arterial thrombosis : studies in canine von Willebrand disease and hemophilia A. *Blood*, 1993, **81**(10), 2644-2651.
- 170.NICOLAS M. In : *Hematoweb, l'hématologie en ligne !* [En ligne] Consultée le 07 décembre 2008, [<http://www.hematoweb.org/fiches.php>].
- 171.NINKOVIC I., WHITE J.G., RANGEL-FILHO A., DATTA Y.H. The role of Rab38 in platelet dense granule defects. *J. Thromb. Haemost.*, 2008, **6**(12), 2143-2151.
- 172.NURDEN A.T. Glanzmann thrombasthenia. *Orph. J. Rare Dis.*, 2006, **1**(10).
- 173.O'MARCAIGH A.S., NICHOLS W.L., HASSINGER N.L., MULLINS J.D., MALLOUH A.A., GILCHRIST G.S. *et al.* Genetic analysis and functional characterization of prothrombins Corpus Christi (Arg382-Cys), Dhahran (Arg271-His), and hypoprothrombinemia. *Blood*, 1996, **88**(7), 2611-2618.
- 174.OMIA (Online Mendelian Inherited in Animals) [En ligne] Consultée le 07 décembre 2008, [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omia/>].
- 175.OMIM (Online Mendelian Inherited in Man) [En ligne] Consultée le 07 décembre 2008, [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>].
- 176.OLSEN E.H.N., MCCAIN A.S., MERRICKS E.P., FISCHER T.H., DILLON I.M., RAYMER R.A. *et al.* Comparative response of plasma VWF in dogs to up-regulation of VWF mRNA by interleukin-11 Weiber-Palade body release by desmopressin (DDAVP). *Blood*, 2003, **102**(2), 436-441.
- 177.PARRY B.W., HOWARD M.A., MANSELL P.D., HOLLOWAY S.A. Haemophilia A in German shepherd dog. *Aust. Vet. J.*, 1988, **65**(9), 276-279.

- 178.PATHAK E. Type 3 von Willebrand's disease in a Shetland sheepdog. *Can. Vet. J.*, 2004, **45**, 685-687.
- 179.PEROU C.M., MOORE K.J., NAGLE D.L., MISUMI D.J., WOOLF E.A., McGRAIL S.H. et al. Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. *Nat. Genet.*, 1996, **13**(3), 303-308.
- 180.PETERSON M.E., DODDS W.J. Factor IX deficiency in an Alaskan malamute. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1979, **174**, 1326-1327.
- 181.POLLER L., THOMSON J.M., SEAR C.H., THOMAS W. Identification of a congenital defect of factor VII in a colony of beagle dogs : the clinical use of the plasma. *J. Clin. Path.*, 1971, **24**, 626-632.
- 182.PONS P. *Exploration de la coagulation plasmatique chez le chien : essai du SCA 2000*. Thèse Méd. Vét., Toulouse, 2002, n°58, 41 p.
- 183.PONTOIS M. Troubles héréditaires de l'hémostase chez le chien. *Encyclopédie Vétérinaire*, 1992, Biologie clinique 0400.
- 184.POON M.C., DEMERS C., JOBIN F., WU J.W.Y. Recombinant factor VIIa is effective for bleeding and surgery in patients with Glanzmann thrombasthenia. *Blood*, 1999, **94**(11), 3951-3953.
- 185.PRIEUR D.J., COLLIER L.L. Chédiak-Higashi syndrome. *Am. J. Pathol.*, 1978, **90**(2), 533-536.
- 186.RAYMOND S.L., JONES D.W., BROOKS M.B., DODDS W.J. Clinical and laboratory features of a severe form of von Willebrand disease in Shetland sheepdogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1990, **197**(10), 1342-1346.

187. RIEGER M., SCHWARTZ H.P., TURECEK P.L., DORNER F., VAN MOURIK J.A., MANNHALTER C. Identification of mutations in the canine von Willebrand factor gene associated with type III von Willebrand disease. *Thromb. Haemost.*, 1998, **80**(2), 332-337.
188. RIEHL J., OKURA M., MIGNOT E., NISHINO S. Inheritance of von Willebrand's disease in a colony of Doberman Pinschers. *Am. J. Vet. Res.*, 2000, **61**(2), 115-120.
189. RINGOT D. *La maladie de von Willebrand chez le chien. Etude bibliographique.* Thèse Méd. Vét., Toulouse, 1998, n°104, 158 p.
190. RUIZ C., LIU C.Y., SUN Q.H., SIGAUD-FIKS M., FRESSINAUD E., MULLER J.Y. *et al.* A point mutation in the cysteine-rich domain of glycoprotein (GP) IIIa results in the expression of a GPIIb-IIIa (α IIb β 3) integrin receptor locked in a high-affinity state and a Glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Blood*, 2001, **98**(8), 2432-2441.
191. RUSSELL K.E., OLSEN E.H., RAYMER R.A., MERRICKS E.P., BELLINGER D.A., READ M.S. *et al.* Reduced bleeding events with subcutaneous administration of recombinant human factor IX in immune-tolerant hemophilia B dogs. *Blood*, 2003, **102**, 4393-4398.
192. SARKAR R., TETREAULT R., GAO G., WANG L., BELL P., CHANDLER R. *et al.* Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. *Blood*, 2004, **103**, 1253-1260.
193. SCALLAN C.D., LILICRAP D., JIANG H., QIAN X., PATARROYO-WHITE S.L., PARKER A.E. *et al.* Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector. *Blood*, 2003, **102**(6), 2031-2037.
194. SCHALM O.W., JAIN N.C., CARROLL E.J. Blood coagulation and fibrinolysis. *In* : *Veterinary hematology*. 3rd ed. Philadelphia : Léa and Fabiger, 1975, 284-300.
195. SHEN W.Z., DING Q.L., JIN P.P., WANG X.F., JIANG Y.Z., LI S.M. *et al.* A novel Pro126His β propeller mutation in integrin α IIb causes Glanzmann thrombasthenia by impairing

progression of pro- α IIb β 3 form endoplasmic reticulum of Golgi. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2008, 7 pages (non publié).

- 196.SHERDING R.G., DI BARTOLA S.P. Hemophilia B (factor IX deficiency) in an old English sheepdog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1980, **176**, 141-142.
- 197.SHI Q., WILCOX D.A., FAHS S.A., WEILER H., WELLS C.W., COOLEY B.C. *et al.* Factor VIII ectopically targeted to platelets is therapeutic in hemophilia A with high-titer inhibitory antibodies. *J. Clin. Invest.*, 2006, **116**(7), 1974-1982.
- 198.SOUTE B.A., ULRICH M.M., WATSON A.D., MADDISON J.E., EBBERINK R.H., VERMEER C. Congenital deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors due to a defective vitamin K-dependent carboxylase in Devon Rex cats. *Thromb. Haemost.*, 1992, **68**(5), 521-525.
- 199.SPRONK H.M.H., FARAH R.A., BUCHANAN G.R., VERMEER C., SOUTE B.A.M. Novel mutation in the γ -glutamyl carboxylase gene resulting in congenital combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood*, 2000, **96**(10), 3650-3652.
- 200.SPURLING N.W., BURTON L.K., PILLING T. Canine factor VII deficiency : experience with a modified thrombotest method in distinguishing between the genotypes. *Res. Vet. Sci.*, 1974, **16**, 228-239.
- 201.SPURLING N.W., PEACOCK R., PILLING T. The clinical aspects of canine factor VII deficiency including some case histories. *J. Small Anim. Pract.*, 1974, **15**, 229-239.
- 202.STOKOL T., PARRY B.W., MANSELL P.D. Von Willebrand disease in Doberman dogs in Australia. *Austr. Vet. J.*, 1995, **72**(7), 257-262.
- 203.STOKOL T., PARRY B.W., MANSELL P.D., RICHARDSON J.L. Hemorrhachis associated with hemophilia A in three German shepherd dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1994, **30**, 239-243.

- 204.STORB R.,MARCHIORO T.L., GRAHAM T.C., WILLEMIN M., HOUGIE C., THOMAS E.D. Canine hemophilia and hematopoietic grafting. *Blood*, 1972, **40**, 234-238.
- 205.TABLIN F., WALKER N.J., KLEIN S.D., FIELD C.L., CROWE J.H. Animal models for studies on cold-induced platelet activation in human beings. *J. Lab. Clin. Med.*, 2000, **135**(4), 339-346.
- 206.TATSUMI K., OHASHI K., KATAOKA M., TATENO C., SHIBATA M., NAKA H. *et al.* Successful in vivo propagation of factor IX-producing hepatocytes in mice : potential for cell-based therapy in haemophilia B. *Thromb. Haemost.*, 2008, **99**(5), 799-800.
- 207.TCHERNEVA E., HUFF A.M., GIGER U. Coagulation factor XI deficiency in Kerry blue terrier dogs is caused by an exonic sine insertion. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006, **20**(3), 767, abstract.
- 208.TOLMACHOVA T., ABRINK M., FUTTER C.E., AUTHI K.S., SEABRA M.C. Rab27b regulates number and secretion of platelet dense granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, **104**(14), 5872-5877.
- 209.TROXEL M.T., BROOKS M.B., ESTERLINE M.L. Congenital factor XI deficiency in a domestic shorthair cat. *J. Am. Anim Hosp. Assoc.*, 2002, **38**, 549-553.
- 210.TROY G.C. An overview of hemostasis. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.*, 1988, **18**(1), 5-20.
- 211.TURECEK P.L., GRITSCH H., PICHLER L., AUER W., FISCHER B., MITTERER A. *et al.* *In vivo* characterization of recombinant von Willebrand factor in dogs with von Willebrand disease. *Blood*, 1997, **90**, 3555-3567.
- 212.TURRENTINE M.A., HAHN A.W., JOHNSON G.S. Factor VIII complex in canine plasma after submaximal treadmill exercise. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 39-42.

- 213.VAN BOVEN H.H., OLDS R.J., THEIN S.L., REITSMA P.H., LANE D.A., BRIET E. *et al.* Hereditary antithrombin deficiency : heterogeneity of the molecular basis and mortality in dutch families. *Blood*, 1994, **84**(12), 4209-4213.
- 214.VAN HYLCKAMA Vlieg A., VAN DER LINDEN I.K., BERTINA R.M., ROSENDAAL F.R. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood*, 2000, **95**(12), 3678-3682.
- 215.VAN OOST B.A., VERSTEEG S.A., SLAPPENDEL R.J. DNA testing for type II von Willebrand disease in Dutch kookier dogs. *J. Vet. Intern. Med.*, 2004, **18**, 282-288.
- 216.VENTA P.J., LI J., YUZBASIYAN-GURKAN V., BREWER G.J., SCHALL W.D. Mutations causing von Willebrand's disease in Scottish terriers. *J. Vet. Intern. Med.*, 2000, **14**(1), 10-19.
- 217.VERLANDER J.W., GORMAN N.T., DODDS W.J. Factor IX deficiency (hemophilia B) in a litter of Labrador retrievers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1984, **185**(1), 83-84.
- 218.VERSTEEG S.A., EVERTS R.E., SHAPPENDEL R.J., VAN OOST B.A. Genetic and physical ordering of polymorphic DNA markers in the region of the canine von Willebrand factor gene. *Anim. Gen.*, 2000, **31**, 414-415.
- 219.VETTORE S., SCANDELLARI R., MORO S., LOMBARDI A.M., SCAPIN M., RANDI M.L. *et al.* Novel point mutation in a leucine-rich repeat of the GPIIb chain of the platelet von Willebrand factor receptor, GPIIb/IX/V, resulting in an inherited dominant form of Bernard-Soulier syndrome affecting two unrelated families : the N41H variant. *Haematologica*, 2008, **93**, 1743-1747..
- 220.WEI M.L. Hermansky-Pudlak syndrome : a disease of protein trafficking and organelle function. *Pigment Cell Res.*, 2005, **19**, 19-42.
- 221.WHEELER S.L., WEINGAND K.W., THRALL M.A., BERG R.J., SCHWARZ P.D., OLSON P.N. Persistent uterine and vaginal hemorrhage in a Beagle with factor VII deficiency. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1984, **185**(4), 447-448.

222. WHITE G.C., SHOEMAKER C.B. Factor VIII and hemophilia A. *Blood*, 1989, **73**(1), 1-12.
223. WILKERSON M.J., JOHNSON G.S., STOCKHAM S., RILEY L. Afibrinogenemia and a circulating antibody against fibrinogen in a bichon frise dog. *Vet. Clin. Pathol.*, 2005, **34**(2), 148-155.
224. WITHNALL E., GIGER U. Effects of recombinant human activated factor VII and canine fresh frozen plasma in Beagles with hereditary coagulation factor VII deficiency. *J. Vet. Intern. Med.*, 2006, **20**, 766 (abstract).
225. WUEPPER K.D., MILLER D.R., LACOMBE M.J. Flaujeac trait. Deficiency of human plasma kininogen. *J. Clin. Invest.*, 1975, **56**, 1663-1672.
226. ZUCKER M., ZIVELIN A., LANDAU M., SALOMON O., KENET G., BAUDUER F. *et al.* Characterization of seven novel mutations causing factor XI deficiency. *Haematol.*, 2007, **92**(10), 1375-1380.

LES TROUBLES HÉRÉDITAIRES DE L'HÉMOSTASE CHEZ LES CARNIVORES DOMESTIQUES

NOM et Prénom : LEGRU Samuel

Résumé

Après un rappel des mécanismes de l'hémostase et de son exploration, cette étude bibliographique dresse un bilan des connaissances actuelles, des traitements et des futures orientations de la recherche pour les troubles héréditaires de l'hémostase chez les carnivores domestiques. Sont étudiés dans un premier temps, les thrombopathies constitutionnelles et la maladie de von Willebrand, troubles de l'hémostase primaire. Enfin, les troubles héréditaires de la coagulation notamment les hémophilies A et B sont décrits dans une dernière partie.

Mots clés

TROUBLE DE L'HEMOSTASE / MALADIE HEREDITAIRE / GENETIQUE / HEMOSTASE
PRIMAIRE / THROMBOPATHIE / HEMOPHILIE / COAGULATION / CARNIVORE / CHIEN /
CHAT

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Dr. F. BERNEX

Assesseur : Dr. M. ABITBOL

Adresse de l'auteur :

Samuel LEGRU
81, rue Pierre Brossolette

62410 WINGLES

INHERITED DISORDERS OF HEMOSTASIS IN DOGS AND CATS

SURNAME : LEGRU Samuel

Summary

After a recall of the mechanisms of hemostasis and its exploration, this bibliographic study draws up a balance-sheet of the current knowledges, the treatments and the future positioning of research for the inherited disorders of hemostasis in dogs and cats. Constitutional thrombopathia and von Willebrand's disease, disorders of primary hemostasis, are studied in a first time. Disorders of coagulation in particular hemophilia A and B are described in the last part.

Keywords

DISORDERS OF HEMOSTASIS / INHERITED DISEASE / GENETIC / PRIMARY HEMOSTASIS / THROMBOPATHIA / HEMOPHILIA / COAGULATION / CARNIVORE / DOG / CAT

Jury

President : Pr.

Director : Dr. F. BERNEX

Assessor : Dr. M. ABITBOL

Author's address

Samuel LEGRU

81, rue Pierre Brossolette

62410 WINGLES